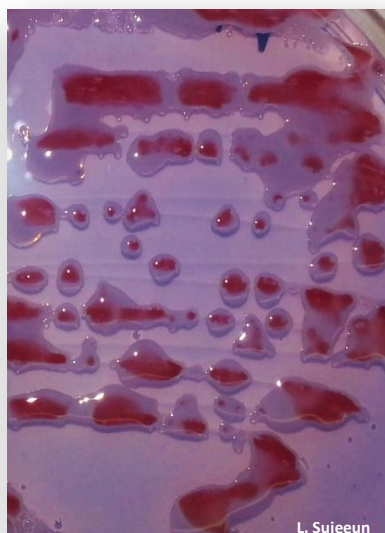


## MEMOIRE DE STAGE

---

Rôle des effecteurs de type III dans l'interaction *Ralstonia solanacearum*/aubergine : approches de génétique évolutive et fonctionnelle

---



**Lakshmi SUJEEUN**

Master 2 – Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux

Année universitaire 2013-2014

Maîtres de stage :

Pr. **Stéphane POUSSIER**, Bactériologiste

Dr. **Emmanuel WICKER**, Phytobactériologiste

UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), CIRAD/Université de La Réunion, Pôle de Protection des Plantes (3P)



## **Remerciements**

Toute ma gratitude, va en premier lieu à mes encadrants Emmanuel Wicker et Stéphane Poussier. Ce fut un immense honneur pour moi d'être à nouveau votre stagiaire ! Merci à vous, pour l'autonomie que vous avez su me laisser, merci pour vos conseils, votre soutien, gentillesse, disponibilité et patience tout au long de ce stage. Je souhaite également remercier Bernard Reynaud pour m'avoir accueillie au sein de sa structure.

Merci à Jérémy d'avoir été là pour me soutenir, et m'enrichir toujours un peu plus par ton vécu ! Merci pour ton aide pendant les manip en chambres climatiques.

Je tiens également à remercier Edith d'avoir été à mes côtés au laboratoire par moment indispensable !!

Je tiens à faire un petit clin d'œil à mes collègues de box Anaïs et Angélique, et Ludivine qui m'ont encouragé tout au long de ce stage... Enfin je tiens à remercier ma petite famille : Maman, Papa, Aks et Mel... Vous avez été là pour me rebooster dans les moments difficiles !

Au-delà de l'acquisition de techniques de connaissances et du raisonnement scientifique, ce stage m'a permis de gagner en maturité. Tout ceci n'aurait pu être réalisé sans un ensemble de personnes qui ont contribué de près comme de loin, au bon déroulement de ces travaux et à qui j'adresse mes plus sincères remerciements ainsi que mes plus profonds respects.

## Liste des figures

**Figure 1.** Evolution du système immunitaire des plantes en réponse à l'adaptation du pouvoir infectieux des agents pathogènes, selon le modèle en zigzag.

**Figure 2.** Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) des bactéries phytopathogènes.

**Figure 3.** Symptôme de flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* sur aubergine.

**Figure 4.** Correspondance entre phylotypes, clades et anciennes classifications de *R. solanacearum*.

**Figure 5.** Réseau d'échange de gènes entre les différents phylotypes de *R. solanacearum*.

**Figure 6.** Disposition des plants d'aubergine dans le rotoplan et méthode d'inoculation de *Ralstonia solanacearum*.

**Figure 7.** Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sur aubergine .

**Figure 8.** Méthode d'inoculation par injection.

**Figure 9.** Classification hiérarchique ascendante des 91 souches de *Ralstonia solanacearum*.

**Figure 10.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Maximum-likelihood .

**Figure 11.** Symptômes finaux observés sur feuilles d'aubergine E6/E8 à 84 heures après inoculation des mutants d'effecteurs et de la souche sauvage GMI1000

**Figure 12.** Taux de colonisation final (en %) (84 heures après inoculation) sur aubergine E6/E8 la souche sauvage GMI1000 et des souches mutantes d'effecteurs de GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Phylotype, hôte d'isolement et origine géographique des 14 génomes séquencés et publiés des souches représentatives du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*.

**Tableau 2.** Phylotype, hôte d'isolement, origine géographique et virulence sur aubergine E6/E8 des neuf génomes des souches de *Ralstonia solanacearum* nouvellement séquencés par le laboratoire du CIRAD de La Réunion.

**Tableau 3.** Liste des 10 effecteurs de type III (ET3) identifiés chez *Ralstonia solanacearum* et sélectionnés pour cette étude.

**Tableau 4.** Localisation et fonctions des huit gènes de ménage présents chez *Ralstonia solanacearum* sélectionnés pour cette étude.

**Tableau 5.** Distribution des 10 gènes ET3 étudiés parmi onze génomes séquencés des phylotypes I, II, III et IV.

**Tableau 6.** Liste des six mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* fournis par le LIPM

**Tableau 7.** Polymorphisme de taille des 10 effecteurs au sein de 78 souches de la collection bactérienne soumises à l'amplification PCR.

**Tableau 8.** Présence (1)/absence(0) des 10 effecteurs au sein des (i) neuf génomes des souches de *Ralstonia solanacearum* nouvellement séquencées par le laboratoire et (ii) quatre génomes de référence des phylotypes I, IIA, IIB et III.

**Tableau 9.** Pathogénicité et phénotype de virulence sur cultivar E6 des 20 souches de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I sur aubergine.

**Tableau 10.** Pathogénicité et phénotypes de virulence des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine.

**Tableau 11.** Concentration bactérienne finale (CFU.g<sup>-1</sup>) des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*.

## Liste des acronymes

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**CFU** : Unité formant colonie (*Colony Forming Unit*)

**CGH** : Hybridation génomique comparative (*Comparative Genomic Hybridization*)

**CIRAD** : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

**Core-TEP** : Collection de cultivars de tomate-aubergine-piment (*Tomato-Eggplant-Pepper*)

**EPS** : Exopolysaccharides

**ET3** : Effecteur de Type III (*Type III Effector protein*)

**ETI** : Immunité déclenchée par les effecteurs (*Effector-Triggered Immunity*)

**ETS** : Sensibilité liée aux effecteurs (*Effector-Triggered Susceptibility*)

**GENETOM** : Lutte génétique contre les maladies émergentes chez les solanées maraîchères

**HR** : Réaction hypersensible (*Hypersensitive Response*)

**Hrp** : Gène associé à la pathogénicité et à la réaction hypersensible (*Hypersensitive Response and Pathogenicity*)

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**LG** : Groupe de liaison (*Linkage Group*)

**MLSA** : Analyse de séquences multilocus (*MultiLocus Sequence Analysis*)

**NS2** : Niveau de Sécurité 2

**NS3** : Niveau de Sécurité 3

**PAMPs** : Motifs moléculaires associés à l'agent pathogène (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction*)

**PRRs** : Récepteurs de reconnaissance de motifs (*Pattern Recognition Receptors*)

**PTI** : Immunité déclenchée par les PAMPs (*PAMPs-Triggered Immunity*)

**PVBMT** : Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical

**QTL** : Loci à caractère quantitatif (*Quantitative Trait Loci*)

**SST3** : Système de Sécrétion de Type III (*Type III Secretion System*)

**UMR** : Unité Mixte de Recherche



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Interactions plante/pathogène et durabilité des résistances variétales .....</b>	<b>1</b>
1.1. Le dialogue moléculaire entre plante et bactérie : une histoire en zigzag .....	2
1.2. Forces évolutives chez les agents pathogènes des plantes.....	2
<b>2. Le système de sécrétion de type III et ses effecteurs : acteurs essentiels de la virulence bactérienne .....</b>	<b>3</b>
2.1. Le système de sécrétion de type III et ses effecteurs .....	3
2.2. Les répertoires d'effecteurs .....	4
<b>3. Contexte biologique et objectifs du stage.....</b>	<b>5</b>
3.1. Modèle d'étude : le pathosystème <i>Ralstonia solanacearum</i> /aubergine .....	5
3.1.1. Principales caractéristiques de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	5
3.1.2. La résistance à <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	7
3.2. Etat des connaissances des génomes séquencés chez <i>Ralstonia solanacearum</i> et de ses effecteurs.....	8
3.3. Problématique et objectifs de travail .....	10
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>11</b>
<b>1. Matériel biologique .....</b>	<b>11</b>
1.1. Matériel végétal .....	11
1.2. Collection bactérienne .....	11
<b>2. Mise en culture des souches et extraction d'ADN.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Etude génotypique : sélection des gènes de ménage et ET3, amplification par PCR et séquençage .....</b>	<b>12</b>
3.1. Sélection des gènes de ménage et des amorces PCR.....	12
3.2. Sélection des ET3 et définition des amorces PCR.....	12
3.3. Amplifications des ET3 et gènes de ménage par PCR .....	13
3.4. Analyse des séquences nucléiques et construction d'arbres phylogénétiques.....	13
<b>4. Phénotypage de souches représentatives de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur aubergine E6/E8 .....</b>	<b>14</b>



4.1. Dispositif expérimental et méthode d'inoculation .....	14
<b>5. Phénotypage de mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 .....</b>	<b>15</b>
5.1. Dispositif expérimental et méthode d'inoculation.....	15
5.2. Test de charge bactérienne et suivi d'incidence du flétrissement bactérien .....	16
<b>6. Analyse des données .....</b>	<b>16</b>
6.1. Typologie : identification des groupes de répertoires d'effecteurs .....	16
6.2. Distinction des valeurs des taux de flétrissement, taux de colonisation et typologie phénotypique des souches .....	17
<b>RESULTATS.....</b>	<b>17</b>
<b>1. Etude génotypique : présence et polymorphisme des gènes ciblés et analyses phylogénétiques</b>	<b>17</b>
1.1. Mise en évidence de la présence et du polymorphisme des gènes étudiés dans la collection bactérienne .....	18
1.2. Réalisation des répertoires d'effecteurs et lien avec le phylotype des souches.....	18
1.3. Analyses phylogénétiques des arbres générés par la MLSA et les ET3 .....	19
<b>2. Etude phénotypique : taux de flétrissement et taux de colonisation des souches inoculés .....</b>	<b>20</b>
<b>3. Etude phénotypique des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....</b>	<b>20</b>
3.1. Taux de flétrissement, taux de colonisation et charge bactérienne .....	20
3.2. Corrélation entre notations de nécrose et colonisation .....	21
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Approche évolutive : détermination des répertoires d'effecteurs et analyses phylogénétiques .</b>	<b>21</b>
1.1. La distribution des effecteurs se structure en 11 profils .....	21
1.2. Les analyses phylogénétiques révèlent des cas d'incongruence.....	22
<b>2. Approche fonctionnelle : bilan sur l'inoculation des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 et des tests HR.....</b>	<b>23</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>24</b>



# INTRODUCTION

## 1. Interactions plante/pathogène et durabilité des résistances variétales

Dans leurs milieux, les plantes sont fréquemment soumises à de nombreuses attaques d'agents pathogènes tels que les bactéries, virus, champignons ou nématodes. Dans le cas d'une interaction de type « non hôte », il y a incompatibilité fondamentale entre tous les cultivars<sup>1</sup> d'une espèce et tous les biotypes<sup>2</sup> d'un pathogène donné (Mysore and Ryu, 2004; Nurnberger and Lipka, 2005). Dans le cas d'une interaction de type « hôte », deux voies sont possibles : (i) la plante sensible est colonisée par l'agent pathogène virulent qui s'y multiplie et se nourrit de l'hôte, et il y a établissement de la maladie (interaction compatible) ou bien (ii) le pathogène, qualifié d'avirulent, échoue à pénétrer et se multiplier dans la plante résistante suite à l'induction de réactions de défense très intenses (réaction hypersensible<sup>3</sup> et mort cellulaire) (interaction incompatible). Dans le cas de la résistance, les réponses de défense de la plante sont dites gène-spécifiques (Flor, 1971). L'intensité des défenses végétales et l'efficacité des armes microbiennes conditionnent l'issue de l'interaction : mise en place de la maladie ou résistance de la plante. D'une manière plus fine, cela détermine le degré de développement de la maladie et de résistance de la plante (Poueymiro, 2009).

L'intensification des cultures a entraîné une perte de diversité des espèces et une augmentation de la densité en hôtes potentiels pour les microorganismes phytopathogènes (Stukenbrock and McDonald, 2008), multipliant ainsi l'utilisation des produits phytosanitaires. Une méthode alternative à l'utilisation de ces traitements chimiques consiste à sélectionner et déployer des plantes résistantes (Bousset et al., 2011). Toutefois, les exemples de contournement de ces résistances génétiques dues à l'adaptation des populations pathogènes sont nombreux (Moury et al., 2010). Van den Bosch et Gilligan (2003) définissent le concept de durabilité de résistance comme la mesure du laps de temps entre l'introduction de la plante résistante dans l'agrosystème et le moment où le génotype virulent du pathogène (i.e. le génotype capable de contourner la résistance de la plante et donc d'induire la maladie) atteint une fréquence égale à un seuil défini, au-delà duquel la résistance est considérée comme inefficace ou contournée. Deux facteurs sont impliqués dans la prédiction de la durabilité de cette résistance : (i) le potentiel évolutif des populations d'agents pathogènes et (ii) les mécanismes de défense de la plante (McDonald and Linde, 2002). Les effecteurs<sup>4</sup>, codés par les agents pathogènes, ont été montrés comme des acteurs clés de l'interaction hôte/pathogène et contribuant pour certains d'entre eux à la fitness<sup>5</sup> bactérienne : ils représentent donc une cible privilégiée pour estimer la durabilité de résistance des plantes (Ponciano et al., 2003; Alfano and Collmer, 2004).

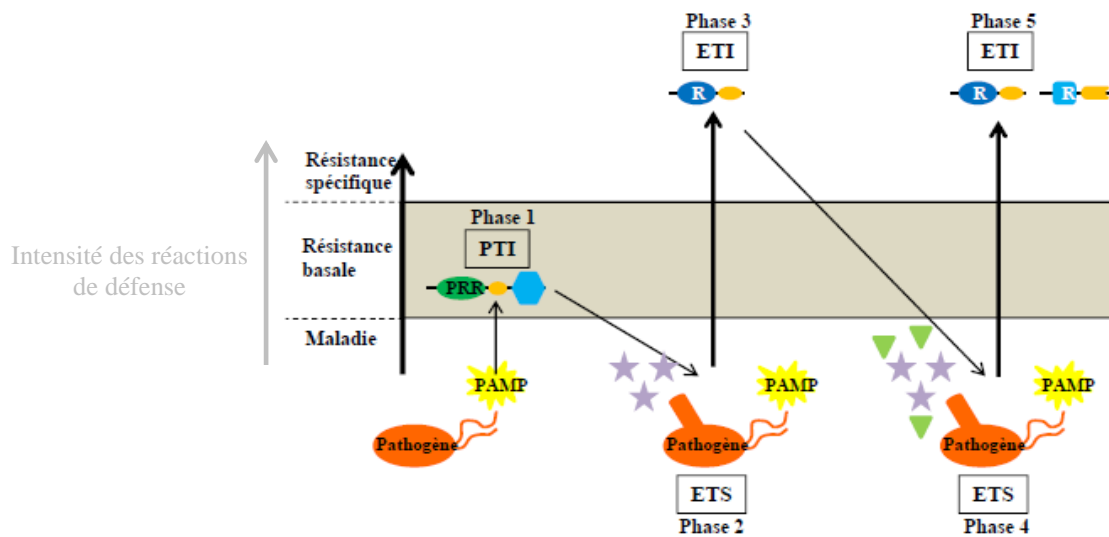
<sup>1</sup> **Cultivar** : variété cultivée issue de la sélection (Spooner, 2003).

<sup>2</sup> **Biotype** ou biovar : variété qui, au sein d'une espèce, se distingue d'une autre par une caractéristique biochimique (Claridge and den Hollander, 1983).

<sup>3</sup> **Réaction hypersensible** ou HR : réaction spécifique d'une plante à l'attaque d'un pathogène (Ward, 1902; Marryat, 1907).

<sup>4</sup> **Effecteurs** : protéines sécrétées et/ou injectées par un agent pathogène dans un hôte. Ces protéines favorisent la survie et la multiplication de l'agent pathogène dans l'hôte ou au contraire induisent les réactions de défense de l'hôte stoppant ou limitant la multiplication du pathogène (Ponciano et al., 2003).

<sup>5</sup> **Fitness** ou valeur adaptative : contribution moyenne de chaque individu d'un génotype donné à la génération suivante (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr>), ou plus généralement : capacité d'un organisme à survivre et à se reproduire dans un environnement donné.



**Figure 1.** Evolution du système immunitaire des plantes en réponse à l'adaptation du pouvoir infectieux des agents pathogènes, selon le modèle en zigzag (d'après Jones and Dangl, 2006 in Denancé, 2011).

Phase 1 : Les plantes détectent les PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) grâce aux PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), ce qui induit la PTI (*PAMPs-Triggered Immunity*).

Phase 2 : Les agents pathogènes non reconnus par la plante délivrent des effecteurs (étoiles violettes) sécrétés dans les cellules végétales où ils vont bloquer l'établissement de la PTI. Il y a alors développement de la maladie ou sensibilité déclenchée par les effecteurs ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*).

Phase 3 : Les plantes ont mis au point des protéines R de résistance, capables de reconnaître spécifiquement certains effecteurs. Il y a alors établissement d'un second niveau de défense plus élevé ou immunité déclenchée par les effecteurs ETI (*Effector-Triggered Immunity*).

Phase 4 : Le processus d'évolution a conduit les agents pathogènes à diversifier leur panel d'effecteurs dont certains (triangles verts) sont capables d'inhiber ou retarder les réponses de l'ETI pour aboutir de nouveau à la maladie (ETS).

Phase 5 : En retour, les plantes développent de nouvelles protéines R afin de cibler les nouveaux effecteurs, et redevenir résistantes en déclenchant les réponses de l'ETI.

### 1.1. Le dialogue moléculaire entre plante et bactérie : une histoire en zigzag

Dans la nature, plantes et agents pathogènes ont tous deux développé des mécanismes pour orienter l'issue de l'interaction en leur faveur. L'interaction plante/bactérie peut être illustrée par un modèle en zigzag, synthétisant les stratégies utilisées par les deux partenaires dans leur course à l'armement au cours du processus d'évolution des espèces (Jones and Dangl, 2006; Cui et al., 2009) (Figure 1).

Les microorganismes possèdent des composants de surface (flagelles, composants de la paroi, etc.) renfermant des signatures moléculaires très conservées, appelées PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ces PAMPs sont spécifiquement reconnus par des récepteurs PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) de plantes (Figure 1, Phase 1). Cette reconnaissance induit une cascade de signalisation moléculaire et l'activation des réponses de défense basale des plantes ou PTI (*PAMPs-Triggered Immunity*) (Figure 1, Phase 1) (Segonzac and Zipfel, 2011). Pour supprimer cette première ligne de défense, les agents pathogènes ont développé un panel d'effecteurs conduisant au développement de la maladie : ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*) (Figure 1, Phases 2 et 4). Les plantes ont alors développé des protéines R de résistance, capables de reconnaître spécifiquement les effecteurs. Une seconde cascade d'induction de gènes de défense se met ainsi en place ou ETI (*Effector-Triggered Immunity*) conduisant à une résistance spécifique de type gène-pour-gène (R-Avr) (Figure 1, Phases 3 et 5), avec des réponses de forte intensité (mort cellulaire, blocage de la progression du pathogène, émission de phytoalexines<sup>6</sup>, etc.). Ce second niveau de défense spécifique est activée lors d'une interaction incompatible entre une plante hôte et un agent pathogène (Jones and Dangl, 2006).

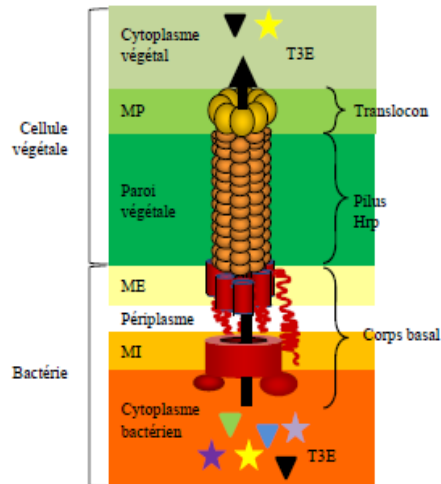
### 1.2. Forces évolutives chez les agents pathogènes des plantes

McDonald et Linde (2002) proposent que la durabilité de résistance peut être prédite en considérant les différents paramètres du potentiel évolutif d'un pathogène. Le potentiel évolutif d'une population pathogène est dépendant de la structure génétique de cette population. La structure génétique est définie comme la quantité et la distribution de la diversité génétique au sein et entre les populations. Cinq forces évolutives modèlent la structure génétique des populations pathogènes : mutation, dérive, migration, recombinaison et sélection. La mutation et la recombinaison sont deux processus générant de la variabilité génétique dans les populations pathogènes, alors que la dérive génétique (liée à la taille de la population), le flux de gènes et la sélection (induite par un gène de résistance majeure et la résistance quantitative) sont des mécanismes qui influencent la distribution de la diversité génétique dans la population (Burdon, 1993).

Dans le processus de coévolution entre l'hôte et l'agent phytopathogène, les gènes codant les effecteurs représentent des cibles directes des forces évolutives. Les effecteurs du pathogène peuvent être sous sélection diversifiante<sup>7</sup> pour échapper au système de reconnaissance de l'hôte (Hogenhout et al., 2009).

<sup>6</sup> **Phytoalexines** : molécules constituant une réponse de certains végétaux à différentes agressions (Cruickshank, 1963).

<sup>7</sup> **Sélection diversifiante** : forme de sélection favorisant les phénotypes extrêmes au détriment des phénotypes qui ont une valeur intermédiaire (Dajoz, 2012).



**Figure 2.** Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) des bactéries phytopathogènes (Bogdanove et al., 1996 in Denancé, 2011).

Le SST3 ressemble à une seringue composée d'un corps basal enchâssé dans la double membrane de la cellule bactérienne. Il est prolongé par le pilus Hrp qui traverse la paroi végétale et se termine par un translocon (dispositif de translocation) ancré dans la membrane plasmique de la cellule végétale. Le SST3 permet l'injection d'effecteurs (ET3) dans la cellule végétale.

MI : membrane interne de la bactérie, ME : membrane externe de la bactérie, MP : membrane plasmique végétale, ET3 : effecteur de type III.

La résistance gène-pour-gène gouvernée par les gènes R est souvent rendue inefficace par la mutation ou la perte de la fonction d'un gène d'avirulence. Dans les populations pathogènes, les gènes d'avirulence, critiques pour la fitness du pathogène, sont les plus conservés et leur délétion ou leur mutation induit un coût de fitness très important, pouvant entraîner la disparition du variant virulent (Leach et al., 2001). Les effecteurs moins essentiels (i.e. moins sujets à la sélection conservatrice<sup>8</sup>) peuvent muter plus facilement. La sélection d'un gène R qui reconnaît ces gènes d'avirulence critiques serait ainsi plus « durable » : la mutation nécessaire pour contourner ce gène entraînerait en effet une perte de compétitivité chez l'agent pathogène dite « fitness cost » (Ponciano et al., 2003).

## 2. Le système de sécrétion de type III et ses effecteurs : acteurs essentiels de la virulence bactérienne

### 2.1. Le système de sécrétion de type III et ses effecteurs

Chez les bactéries Gram négatives, six systèmes différents sont impliqués dans la sécrétion de déterminants de la virulence (Ponciano et al., 2003). L'injection des effecteurs impliqués dans le pouvoir pathogène dans la cellule végétale et conduisant à l'ETS est dépendante du système de sécrétion de type III ou SST3 (Bogdanove et al., 1996). Présent chez de nombreux agents pathogènes animaux (*Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli*) et chez les bactéries phytopathogènes (*Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum*), le SST3 est un déterminant majeur du pouvoir pathogène (Cornelis, 2006) (Figure 2). Il s'agit d'une seringue moléculaire permettant d'injecter directement un ensemble de protéines, dites effecteurs de type III ou ET3, dans le cytoplasme des cellules hôtes. Sans leur SST3, ces bactéries seraient incapables de se multiplier *in planta*, d'induire la maladie lors d'une interaction compatible, ou une réaction hypersensible lors d'une interaction incompatible (Alfano and Collmer, 2004). Chez la souche référence GMI1000 de *R. solanacearum*, le SST3 est très conservé et est codé par un cluster de gènes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) (Staskawicz et al., 2001; Buttner and Bonas, 2002), situés dans un îlot de pathogénicité<sup>9</sup> sur le mégaplasme (Van Gijsegem et al., 2002).

De nombreux ET3 ont été identifiés chez différentes bactéries et leur nom dépend de l'agent pathogène dont ils sont issus : *Pop* (*Pseudomonas* outer protein) chez *R. solanacearum* (faisant partie du genre *Pseudomonas* à l'époque de cette identification) (Arlat et al., 1994) ou *Rip* (*Ralstonia* injected protein) (Peeters et al., 2014), ou encore *Xop* (*Xanthomonas* outer protein) chez *Xanthomonas* (Noël et al., 2001). Le fait que les ET3 partagent de nombreuses similarités avec les protéines végétales suggère que ces effecteurs agiraient directement comme agonistes ou antagonistes des composants cellulaires des plantes (Genin and Boucher, 2004).

Chaque agent pathogène possède une batterie particulière d'effecteurs conduisant à une spécificité dans son pouvoir pathogène et son spectre d'hôtes (Cai et al., 2011; Potnis et al., 2011). Ces effecteurs ont

<sup>8</sup> **Sélection conservatrice** : méthode de sélection permettant de reproduire les générations successives de plantes identiques aux individus d'origine choisis pour des qualités reconnues pour la production de semences et de plants (Abecassis and Bergez, 2009).

<sup>9</sup> **Îlot de pathogénicité** ou îlot génomique : région instable et mobile des génomes (chromosome et plasmide) bactériens qui se transfère parfois elle-même du génome d'une bactérie à celui d'une autre (Hacker and Carniel, 2001).





des natures, des cibles moléculaires et des fonctions variées (Lin et al., 2008). Les effecteurs ont pour principales fonctions (i) l'activation des réponses de défense de l'hôte suite à la reconnaissance par une protéine R, (ii) l'inhibition de l'activation des réactions de défense de l'hôte induites par d'autres effecteurs d'aviorulence, (iii) l'inhibition des mécanismes de défense de base de l'hôte, (iv) l'induction d'une augmentation du pH et du contenu nutritif de l'apoplasme de la plante facilitant ainsi la multiplication bactérienne, ou encore (v) le mimétisme moléculaire (production des analogues d'hormones des plantes par les effecteurs) (Ponciano et al., 2003; Hogenhout et al., 2009).

La majorité des effecteurs identifiés à ce jour ont été décrits comme des facteurs de virulence et/ou d'aviorulence. Cependant, les connaissances des fonctions de chaque effecteur sont partielles : pour beaucoup d'entre eux, leur rôle, fonction, localisation et mode d'action dans les différents hôtes restent inconnus (Alfano and Collmer, 2004; Bent and Mackey, 2007), probablement dus à la redondance fonctionnelle d'effecteurs (Angot et al., 2006; Solé et al., 2012). De plus, la complexité de la compréhension du rôle des effecteurs vient notamment du fait qu'ils peuvent agir ensemble pour induire un phénotype. Par exemple, un criblage de mutants de la souche Pss190 de *R. solanacearum* basé sur leurs pertes de virulence sur tomate n'a révélé aucun ET3 spécifiquement impliqué dans la virulence (Lin et al., 2008). Remigi et al. (2011) ont montré que les effecteurs de la famille GALA<sup>10</sup> sont collectivement, mais non individuellement, requis pour provoquer une maladie sur *Arabidopsis thaliana* et la tomate.

## 2.2. Les répertoires d'effecteurs

La coévolution entre les agents pathogènes et les plantes a généré des répertoires larges et polymorphes d'effecteurs bactériens ou fongiques et de protéines R végétales (Collmer et al., 2009). Le séquençage d'une séquence génomique complète, son assemblage et son annotation permettent d'identifier le répertoire de gènes codant les effecteurs d'une souche (Collmer et al., 2002; Greenberg and Vinatzer, 2003) selon différentes méthodes telles que la recherche (i) de promoteurs *hrp*-dépendants (Cunnac et al., 2004; Occhialini et al., 2005), (ii) de motifs protéiques atypiques indiquant une fonction potentielle chez les cellules hôtes eucaryotes (Angot et al., 2006), (iii) des signaux de l'export du SST3 situés dans la partie N-terminal des effecteurs transloqués connus (Guttman et al., 2002; Petnicki-Ocwieja et al., 2002). Par ailleurs, les ET3 de *R. solanacearum* présentent des acides aminés spécifiques sur les 35 premières positions de la protéine (Cunnac et al., 2004; Peeters et al., 2014). Par la génomique comparative, il est possible de comparer les distributions de ces gènes (i.e. les répertoires de gènes) entre des souches d'espèces ou pathovars<sup>11</sup> différents. Certains effecteurs sont présents dans toutes les souches (i.e. effecteurs communs, également désignés sous le terme « core-effectome ») tandis que d'autres sont plus spécifiques de souches individuelles ou groupes de souches (i.e. effecteurs variables) (Sarkar and Guttman, 2004; Sarkar et al., 2006; Hajri et al., 2009; O'Brien et al., 2011). Les effecteurs conservés seraient impliqués dans les fonctions

<sup>10</sup> **GALA** : famille de T3E présentant une séquence conservée (GAXxALA) au sein de leur séquence protéique (Angot et al., 2006).

<sup>11</sup> **Pathovar** ou pathotype : groupe de microorganismes partageant un profil de gamme d'hôtes spécifique (Manners, 1993).



telles que la nutrition et la suppression des réponses des mécanismes de défense basale ou encore le développement des symptômes. Quant aux effecteurs variables, ils seraient plutôt associés à des mécanismes spécifiques dont la suppression des réactions hypersensibles ou la spécificité d'hôtes (Poueymiro and Genin, 2009).

Grâce au séquençage à haut débit des génomes, une récente étude réalisée chez la bactérie pathogène du manioc, *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihoti*, a permis d'identifier le core-effectome de souches isolées de 11 pays (de trois continents) sur un pas de temps de 70 ans. Les gènes les plus conservés, ayant probablement un rôle dans la fitness bactérienne, représenteraient ainsi des cibles idéales pour le développement de stratégies de résistance durable. De plus, plusieurs de ces effecteurs ont été déterminés comme étant des orthologues<sup>12</sup> d'effecteurs connus chez *Pseudomonas syringae* et *R. solanacearum*, suggérant ainsi un rôle majeur de ces gènes chez les bactéries phytopathogènes (Bart et al., 2012).

La comparaison des contenus en effecteurs de souches pathogènes sur des gammes d'hôtes similaires a permis de mettre en évidence des corrélations entre les répertoires d'effecteurs de souches génétiquement différentes et la capacité à coloniser certains hôtes (Sarkar et al., 2006; Hajri et al., 2009). Le fait de caractériser des répertoires d'effecteurs amène à se poser plusieurs questions sur le nombre d'effecteurs nécessaires pour inhiber les voies de signalisation de la PTI activées par la présence du pathogène, mais aussi le nombre minimal d'effecteurs nécessaire pour induire la maladie (ETS). Une étude menée sur la déconstruction du répertoire d'effecteurs de *P. syringae* suppose que plusieurs combinaisons possibles d'effecteurs peuvent constituer le set minimum d'effecteurs nécessaire dans le contournement des défenses de la plante et l'induction des symptômes, d'où la difficulté à déterminer le set d'effecteurs indispensables (i.e. core) pour une souche donnée (Cunnac et al., 2011; Lindeberg et al., 2012). Du fait de la duplication des gènes de résistance et de la redondance fonctionnelle d'effecteurs, les répertoires d'effecteurs sont collectivement essentiels mais individuellement non indispensables (Cunnac et al., 2011; Remigi et al., 2011). Ainsi, identifier des groupes d'effecteurs redondants peut potentiellement révéler des processus contribuant aux défenses antimicrobiennes et fournissant des clés pour les protéines cibles des plantes et/ou impliquées dans la reconnaissance des effecteurs (Collmer et al., 2009).

### 3. Contexte biologique et objectifs du stage

#### 3.1. Modèle d'étude : le pathosystème *Ralstonia solanacearum*/aubergine

##### 3.1.1. Principales caractéristiques de *Ralstonia solanacearum*

*R. solanacearum* est un organisme modèle reconnu pour l'étude des interactions plante/microorganisme. Considérée comme responsable de phytobactérioses majeures des cultures alimentaires et ornementales à fort impact économique (Mansfield et al., 2012), *R. solanacearum* est une  $\beta$ -protéobactérie vasculaire d'origine tellurique responsable du flétrissement bactérien sur les Solanacées

<sup>12</sup> **Orthologues** : gènes d'espèces différentes dont les séquences sont homologues et dérivent d'un même gène ancestral, puis ont divergé à la suite d'un événement de spéciation (<http://www.edu.upmc.fr>).

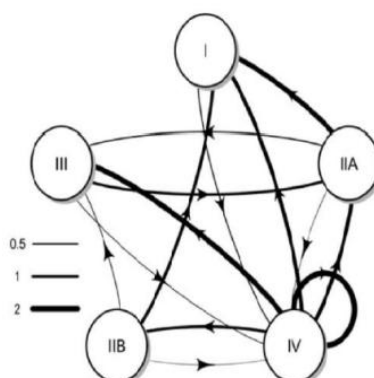


**Figure 3.** Symptôme de flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sur aubergine (Photo : L. Sujeeun 2013).

<i>Ralstonia solanacearum</i>	
Phylotype	I III IIA IIB IV
Clade	1 6 2 3 4 5 N D 7 8 N D
Sequevar <i>egl</i>	<div> <div>13 18 45</div> <div>14 31 46</div> <div>15 34 47</div> <div>17 44 48</div> </div> <div>16 12</div> <div> <div>19 42</div> <div>20 43</div> <div>21 44</div> <div>22 48</div> </div> <div>49 29</div> <div> <div>6 35 41</div> <div>36 50</div> <div>38 52</div> <div>24 39</div> </div> <div>7</div> <div> <div>4A 4NP B</div> <div>1</div> <div>3</div> <div>25</div> <div>26</div> <div>27</div> </div> <div>28</div> <div>8 10</div> <div> <div>9a</div> <div>9b</div> </div> <div>11</div>
Biovar	3 4 5 1 2T 1 1 1 2 1 2T 2T BDB RSY 2A
Race	1 4 5 2 1 2 3 2

Espèce génomique ?  
(Remenant 2010, 2011)

**Figure 4.** Correspondance entre phylotypes, clades et anciennes classifications de *Ralstonia solanacearum*. Les races sont déterminées en fonction des spectres d'hôtes, les biovars en fonction des propriétés métaboliques et les sequevars en fonction des niveaux de similarité nucléotidique sur la séquence partielle du gène de l'endoglucanase (*Egl*) de *R. solanacearum*. Les phylotypes sont corrélés à l'origine géographique des souches et les clades traduisent des lignées évolutives différentes (Fegan and Prior, 2005; Remenant et al., 2010; Wicker et al., 2012).



**Figure 5.** Réseau d'échange de gènes entre les différents phylotypes de *Ralstonia solanacearum*. Flèches : échanges de gènes orientés du donneur vers le receveur. L'épaisseur des flèches est proportionnelle au nombre d'événements de recombinaison (Wicker et al., 2012).

(tomate, aubergine, piment, etc.), les Légumineuses, les Musacées (bananier dessert et plantain), les Aracées (anthurium) ou encore les Cucurbitacées (Kelman, 1954; Buddenhagen et al., 1962; Janse and Schans 1998; Wicker et al., 2009). Elle possède un large spectre d'hôtes de près de 450 espèces végétales appartenant à 54 familles botaniques (Hayward, 1994).

Le flétrissement bactérien est répandu sur les cinq continents : généralement observé dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées chaudes, il est désormais émergent dans les régions tempérées froides d'Europe et des Etats-Unis (Hayward, 1991; Denny, 2006). Le symptôme le plus caractéristique observé chez la plupart des plantes hôtes est le flétrissement soudain et irréversible de l'appareil végétatif aérien (Buddenhagen and Kelman, 1964) (Figure 3). Globalement, la bactérie pénètre dans la plante via les racines (Vasse et al., 1995), colonise le xylème et bloquerait les flux hydriques des tissus conducteurs (Genin, 2010; Poussier, 2000) (Annexe 1). Toutefois, l'intensité des symptômes et leur vitesse d'apparition dépendent de l'hôte (espèce, cultivar, stade de développement), du potentiel d'inoculum (quantité et qualité), de la nature de la souche, mais aussi des conditions agro-environnementales (N'Guessan, 2012).

Du fait de sa très forte variabilité phénotypique et génotypique, *R. solanacearum* est considérée comme un complexe d'espèces par la communauté scientifique (Gillings and Fahy, 1994). L'analyse de séquences partielles de plusieurs gènes de ménage<sup>13</sup> et associés au pouvoir pathogène de cette bactérie (Cook et al., 1989; Gillings et al., 1993; Cook and Sequeira, 1994; Taghavi et al., 1996; Fegan et al., 1998; Poussier, 1999; Poussier et al., 2000a,b) a permis de définir un schéma de classification regroupant les souches de *R. solanacearum* en quatre groupes génomiques nommés phylotypes (Fegan and Prior, 2005) (Figure 4). Ces derniers sont corrélés à l'origine géographique des souches : I (Afrique de l'Est-Asie), II divisé en IIA et IIB (Amérique), III (Afrique) et IV (Indonésie) (Castillo and Greenberg, 2007; Wicker et al., 2012). Une récente étude d'une collection mondiale de souches, basée sur une analyse de séquences multilocus (*MLSA* ou *MultiLocus Sequence Analysis*), a permis de soumettre une classification en cinq lignées évolutives, correspondant aux phylotypes (I, IIA, IIB, III, IV), et huit clades. Cette étude a permis de mettre en évidence que le phylotype I, et plus secondairement le III, présentent un potentiel évolutif élevé, comprenant un haut niveau de recombinaison homologue (Figure 5), des signatures moléculaires d'une expansion démographique récente et rapide, suggérant une forte aptitude à la migration sur de longues distances (Wicker et al., 2012).

Deux concepts permettent d'appréhender le pouvoir pathogène (Andrison, 1995) : (i) la virulence - capacité d'un agent pathogène à provoquer la maladie sur un hôte donné, et (ii) l'agressivité - mesure de la quantité de symptômes induites par l'agent pathogène sur un hôte sensible. Les facteurs génétiques déterminant le pouvoir pathogène chez *R. solanacearum* peuvent être séparés en quatre groupes : (i) les

<sup>13</sup> **Gènes de ménage** : gènes ubiquistes pour une population, caractérisés par une vitesse d'évolution modérée et codant pour des protéines essentielles impliquées dans le métabolisme primaire (Cooper and Feil, 2004).



effecteurs sécrétés par le SST3 (Ponciano et al., 2003), (ii) les exopolysaccharides (EPS) (Denny et al., 1990; Denny, 2006), (iii) les exoenzymes (Schell, 1996; Tans-Kersten et al., 1998), et (iv) les gènes régulateurs à effet pléiotrope<sup>14</sup> (Poussier et al., 2003). Le SST3 est le déterminant majeur de la virulence chez *R. solanacearum* (Boucher et al., 1985; Coll and Valls, 2013). La virulence de *R. solanacearum* est contrôlée par un réseau complexe dont le pivot est le système *Phc* (conversion phénotypique et quorum-sensing<sup>15</sup>) (Schell, 2000). Mais il existe un système en amont du SST3 qui régule l'expression des gènes de *R. solanacearum* dès les phases précoces et durant toute la phase parasitaire dans l'hôte : *hrpG* (Brito et al., 1999; Vasse et al., 2000; Brito et al., 2002; Valls et al., 2006). Ce régulateur clé implique une régulation de nombreux facteurs de virulence et autres fonctions impliquées dans l'adaptation de la cellule bactérienne dans son environnement (Valls et al., 2006; Jeong et al., 2011; O'Connor et al., 2011).

### 3.1.2. La résistance à *Ralstonia solanacearum*

Malgré de nombreux efforts pour diversifier les stratégies de lutte intégrée contre le flétrissement bactérien, la lutte génétique reste la méthode la plus prometteuse (Hayward, 1991). Le développement de sources de résistance universelles et durables a cependant rencontré de nombreuses difficultés liées à (i) la nature essentiellement quantitative et partielle des résistances connues, avec une forte interaction génotype x milieu, mais aussi à (ii) la forte plasticité phénotypique et génotypique de la bactérie (Prior et al., 1994; Wang et al., 1998). L'instabilité de cette résistance peut être expliquée par (i) les connaissances insuffisantes des mécanismes impliqués dans les différents phénotypes de résistance (résistance totale, infections latentes) : une plante pouvant être colonisée par *R. solanacearum* sans développer de symptômes peut être responsable de la multiplication et de la dispersion de la bactérie, (ii) les connaissances insuffisantes des caractéristiques génétiques des souches utilisées dans les programmes de sélection variétale, ou encore (iii) les interactions non connues entre les facteurs génétiques impliqués dans la résistance de l'hôte et la pathogénicité de la bactérie (Lebeau et al., 2011).

Les travaux de thèse menés par Aurore Lebeau (2007-2010) au CIRAD de La Réunion ont permis de formaliser les interactions souche x génotype entre phylotypes de *R. solanacearum* et Solanacées à graines (aubergine, tomate et piment) en six pathoprofiles<sup>16</sup>. Ce grand test de criblage a permis l'identification de sources de résistance de haut niveau, puis de cartographier le gène *ERs1* chez l'aubergine E6, premier gène majeur de résistance à *R. solanacearum* de phylotype I (prédominant dans le monde) dans une espèce d'intérêt agronomique (Lebeau et al., 2011, 2013). Avant ces travaux, seul le gène *RRS1* conférant une résistance majeure à *R. solanacearum* avait été identifié chez la plante modèle *A. thaliana* (Deslandes et al., 2002).

<sup>14</sup> **Gènes pléiotropes** : gènes affectant plusieurs caractéristiques (apparemment sans rapport les uns avec les autres) du phénotype (Morange, 2000).

<sup>15</sup> **Quorum-sensing** : modalité de communication intercellulaire bactérienne permettant aux individus de la population de coordonner un comportement adaptatif aux conditions environnementales quand une certaine densité bactérienne (« quorum ») est atteinte (Miller and Bassler, 2001).

<sup>16</sup> **Pathoprofil** : groupe de souches partageant le même profil de virulence/agressivité sur leur hôte (Lebeau et al., 2011).

**Tableau 1.** Phylotype, hôte d'isolement et origine géographique des 14 génomes séquencés et publiés des souches représentatives du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (Coll and Valls, 2013; Peeters et al., 2014).

Souche	Phylotype	Hôte d'isolement	Origine géographique	Référence
GMI1000	I	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>a</sup>	Guyane	Salanoubat et al., 2002
RS1000	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japon	Mukaihara et al., 2004
Y45	I	<i>Nicotiana tabacum</i> <sup>b</sup>	Chine	Li et al., 2011
FQY_4	I	Pépinière	Chine	Yi et al., 2013
K60	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Etats-Unis	Remenant et al., 2012
CFBP2957	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Martinique	Fegan, M., and Prior, P., 2005; Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J., 1999.
IPO1609	IIB	<i>Solanum tuberosum</i> <sup>c</sup>	Pays Bas	Guidot et al., 2009
UW551	IIB	<i>Pelargonium</i> <sup>d</sup>	Kenya	Gabriel et al., 2006
Molk2	IIB	<i>Musa sp.</i> <sup>e</sup>	Philippines	Guidot et al., 2009
Po82	IIB	<i>Solanum tuberosum</i>	Mexique	Xu et al., 2011
CMR15	III	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Remenant et al., 2011a
PSI07	IV	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Fegan, M., and Prior, P., 2005; Wicker et al., 2007
BDB R229	IV	<i>Musa sp.</i>	Indonésie	Remenant et al., 2011a
<i>R. syzygii</i> R24	IV	<i>Syzygium aromaticum</i> <sup>f</sup>	Indonésie	Remenant et al., 2011b

<sup>a</sup> : tomate, <sup>b</sup> : tabac, <sup>c</sup> : pomme de terre, <sup>d</sup> : géranium, <sup>e</sup> : banane, <sup>f</sup> : girofle



### 3.2. Etat des connaissances des génomes séquencés chez *Ralstonia solanacearum* et de ses effecteurs.

A ce jour, les génomes de 14 souches représentatives des quatre phylotypes de *R. solanacearum* ont été séquencés (GMI1000, RS1000, Y45, FQY\_4, K60, CFBP2957, IPO1609, UW551, Molk2, Po82, CMR15, PSI07, BDB R229 et R24) (Tableau 1) (Coll and Valls, 2013; Peeters et al., 2014). Le séquençage de ces génomes facilite les analyses pan-génomiques afin de déterminer entre autres la fonction et la conservation des effecteurs chez cet agent pathogène, ou de vérifier si les répertoires sont partagés chez les souches pathogènes d'un même hôte, comme c'est le cas chez *P. syringae* (Baltrus et al., 2011; Lindeberg et al., 2012).

Le génome de *R. solanacearum* est organisé en deux réplicons circulaires, chromosome et mégaplasme, dont les tailles sont respectivement de 3,7 Mb et 2,1 Mb chez la souche de référence GMI1000 (Salanoubat et al., 2002). Sur le chromosome, se trouvent 80% des gènes de ménage codant pour les fonctions essentielles à la vie de la bactérie, tandis que le mégaplasme contient des gènes impliqués dans la virulence et l'adaptation de la bactérie à son environnement (Remenant et al., 2010). Les phylogénies établies d'après les gènes du chromosome sont hautement congruentes avec celles établies sur les gènes du mégaplasme, indiquant que ces deux réplicons ont partagé une longue coévolution (Guidot et al., 2007; Lefeuvre et al., 2013).

La grande plasticité de *R. solanacearum* s'illustre par sa structure génomique en mosaïque et la présence de grandes régions à fort biais d'usage de codon et d'îlots génomiques (Salanoubat et al., 2002; Gabriel et al., 2006; Guidot et al., 2007, 2009a,b; Remenant et al., 2010, 2011; Li et al., 2011; Xu et al., 2011). Ainsi, il a été estimé que 16% du génome de la souche GMI1000, incluant des gènes clés du pouvoir pathogène, ont été acquis au cours de l'évolution par transferts horizontaux (Nakamura et al., 2004). Cette forte proportion de gènes acquis par transfert horizontal serait liée à la compétence développée par cette bactérie, permettant la transformation naturelle des souches de *R. solanacearum* (Bertolla et al., 1999). Coupat et al. (2008) ont démontré que 80% des souches de *R. solanacearum* sont capables de transformation naturelle par l'intermédiaire de plasmides et/ou d'ADN génomique, et que des fragments d'ADN de 30 à 90 kb peuvent être transférés entre les souches. La capacité d'échanger des gènes de virulence par transferts horizontaux pourrait ainsi jouer un rôle majeur dans l'évolution rapide de la pathogénicité des souches de *R. solanacearum* (Coupat-Goutaland et al., 2011).

Une analyse de génomique comparative de huit souches représentatives des quatre phylotypes de *R. solanacearum* montre que le core-génome comprend environ 2850 gènes alors que le génome variable compte 3100 gènes (Remenant et al., 2011). Ces core-gènes sont en faible proportion comparée à d'autres bactéries ayant un génome de même taille dont *P. syringae* qui compte environ 3400 core-gènes (Baltrus et al., 2011). Ce constat illustre une nouvelle fois l'importance de la diversité génétique du complexe d'espèces *R. solanacearum* (Genin and Denny, 2012). Probablement dû à son large spectre d'hôtes, *R. solanacearum*



possède un répertoire d'effecteurs exceptionnellement diversifié pouvant comprendre jusqu'à 80 effecteurs alors que les autres bactéries phytopathogènes telles que *Xanthomonas spp.* et *P. syringae* comptent environ 30 à 40 effecteurs. De récentes études réalisées sur 11 souches de *R. solanacearum* estiment environ 110 familles de gènes ET3 dans le complexe d'espèces *R. solanacearum*, avec une moyenne de 60 à 75 ET3 potentiels pour chaque souche. Actuellement, 94 ET3 ont été répertoriés et 16, nouvellement identifiés, sont qualifiés comme candidats (i.e. dont l'expression et la sécrétion par le SST3 n'ont pas été validé expérimentalement) (Coll and Valls, 2013; Peeters et al., 2013, 2014). Récemment, une étude de génomique comparative a permis d'établir un core-effectome de 32 ET3 (famille de gènes *Rip*) présents parmi 10 souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Cette étude montre aussi que neuf ET3 sont sous sélection diversifiante et que cinq, parmi ces neuf ET3, appartiennent au core-effectome (Peeters et al., 2014). Ces résultats reflètent ainsi l'abondance des ET3 chez *R. solanacearum* qui apparaît nettement supérieure à *P. syringae* possédant un core-effectome de seulement cinq ET3 parmi 19 souches étudiées (Baltrus et al., 2011). De plus, des analyses de phylogénie réalisées sur les ET3 de neuf souches de *R. solanacearum* montrent des cas d'incongruence avec les espèces de l'arbre phylogénétique, ce qui laisse supposer une évolution rapide ou l'acquisition de gènes par transferts horizontaux (Peeters et al., 2014).

Une étude menée par Coll et Valls (2013) a permis de préciser que, parmi les 94 ET3 répertoriés, 23 auraient un rôle défini *in planta* chez *R. solanacearum*. Il a été montré que plusieurs ET3, dont *PopP2* (ou *RipP2*, Peeters et al., 2014) (Poueymiro et al., 2009), faciliteraient la multiplication bactérienne chez trois plantes hôtes : l'aubergine, la tomate et le haricot (Macho et al., 2010). D'autres ET3 de *R. solanacearum* ont été décrits comme ayant une fonction d'avirulence : *AvrA* (ou *RipAA*, Peeters et al., 2014) considéré comme le déterminant majeur d'avirulence, conduit à la résistance chez le tabac (Carney and Denny, 1990; Robertson et al., 2004; Poueymiro et al., 2009); *PopP1* (ou *RipP1*, Peeters et al., 2014) chez des variétés de tabac et de pétunia (Lavie et al., 2002), *PopP2* chez *A. thaliana* (Deslandes et al., 2002, 2003; Bernoux et al., 2008), *AWR2* et *AWR5* (ou *RipA2* et *RipA5*, Peeters et al., 2014) chez plusieurs plantes telles que *A. thaliana* et *Nicotiana tabacum* (Solé et al., 2012). Ces études mettent bien en évidence que l'issue de l'interaction entre *R. solanacearum* et ses plantes hôtes dépend à la fois des répertoires d'effecteurs spécifiques des souches et des répertoires de protéines de défense spécifiques des hôtes (Coll and Valls, 2013).

Des études portant sur la dynamique des répertoires des ET3 de *R. solanacearum* montrent qu'ils seraient caractérisés par (Genin and Denny, 2012) : (i) un grand nombre (> 30) de core-ET3 conservés dans toutes les souches séquencées à ce jour, (ii) une diversification importante entre espèces, (iii) une haute spécificité au complexe d'espèces *R. solanacearum* (presque la moitié des ET3 ne sont pas décrits chez d'autres espèces ou genres), et (iv) l'existence de plusieurs familles multigéniques : chaque souche possède plusieurs ET3 appartenant à cinq familles principales. De plus, les souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* partageraient certaines familles d'ET3 avec d'autres pathogènes; par exemple, TAL

**Tableau 2.** Phylotype, hôte d'isolement, origine géographique et virulence sur aubergine E6/E8 des neuf génomes des souches de *Ralstonia solanacearum* nouvellement séquencés par le laboratoire du CIRAD de La Réunion.

Souche	Numéro RUN	Phylotype	Hôte d'isolement	Cultivar	Origine géographique	Virulence
TF31.08	3014	I	<i>Solanum melongena</i> <sup>a</sup>	E6	La Réunion - Vallon	Infections latentes sur E6
RD13.01	3013	I	<i>Solanum melongena</i>	E8	La Réunion - Vallon	Virulence E8
TD13.01	3012	I	<i>Solanum melongena</i>	E8	La Réunion - Vallon	Virulence E8
PSS004	157	I	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>b</sup>	NA	Taiwan	Virulence E6
TO10	969	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	NA	Thaïlande	Virulence E6
CIR011-208	1985	I	<i>Solanum melongena</i>	NA	Guyane	Virulence E6
CFBP3059	39	III	<i>Solanum melongena</i>	NA	Burkina Faso	Virulence E6
CIV 23	1744	I	<i>Solanum melongena</i>	NA	Côte d'Ivoire	Avirulence E6
CFBP7058	215	I	<i>Solanum nigrum</i> <sup>c</sup>	NA	Cameroun	Avirulence E6

NA : données manquantes

<sup>a</sup> : aubergine, <sup>b</sup> : tomate, <sup>c</sup> : morelle

**Tableau 3.** Liste des 10 effecteurs de type III (ET3) identifiés chez *Ralstonia solanacearum* et sélectionnés pour cette étude (Peeters et al., 2014).

Famille de gène ET3	Effecteur putatif	Domaine fonctionnel ou fonctions
RipP1 (PopP1)	RSc0826	Acétyltransférase putative
RipP2 (PopP2)	RSc0868	Acétyltransférase
RipG3 (Gala3)	RSp0023	Protéine F-box LRR
RipN	RSp1130	Domaine nudix hydrolase
RipE1	RSc3369	*
RipAX2	RSp0572	*
RipAJ	RSc2101	*
RipAS	Rsp1384	*
RipAZ1	RSp1582	*
RipAU	RSp1460	*

\* : fonction inconnue

(*Transcription Activator-Like*)-ET3 avec *Xanthomonas spp.* et *AvrPtoB* avec les pathovars de *P. syringae*. (Cunnac et al., 2004; Poueymiro and Genin, 2009).

### 3.3. Problématique et objectifs de travail

Ce stage s'inscrit globalement dans le cadre du projet 2 du Pôle « Biodiversité et Santé Végétales » et champ thématique 2 de l'UMR PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical; CIRAD/Université de La Réunion) qui vise à élaborer des stratégies pertinentes pour le déploiement durable de variétés résistantes au flétrissement bactérien. Un objectif spécifique de ce projet est d'évaluer la durabilité du gène majeur de résistance *ERs1* identifié chez l'aubergine E6 (Lebeau et al., 2013). La détection de souches capables de contourner ce gène en conditions naturelles en Côte d'Ivoire (N'Guessan et al., 2012) et Guyane (Deberdt et al., 2014) mais également en Thaïlande, Indonésie et Taïwan (Lebeau, 2010) amène à se questionner sur la durabilité et la stabilité de ce gène de résistance.

Pour caractériser la durabilité du gène de résistance *ERs1*, il est nécessaire de comprendre l'interaction entre ce gène de résistance et les gènes bactériens associés à l'interaction avec la plante. Plus précisément, ce stage se focalisera sur l'étude du rôle des ET3 impliqués dans cette interaction par des approches complémentaires de génétique évolutive et fonctionnelle et aura pour principaux objectifs de : (i) déterminer les répertoires d'ET3 de souches virulentes ou avirulentes sur E6, dont le génome vient d'être séquencé par le laboratoire (Tableau 2), (ii) comparer les répertoires d'ET3 (présence/absence, variation allélique) dans une large collection de souches, en se focalisant sur les ET3 les plus fortement associés à l'avirulence d'après les résultats préliminaires obtenus au laboratoire (Pensec, 2010), (iii) établir un lien entre le répertoire d'ET3 et le phénotype des souches sur aubergine et (iv) valider ou infirmer des hypothèses, au plan fonctionnel, quant à l'implication de certains ET3 dans l'interaction *R. solanacearum*/aubergine résistante E6.

La PCR et le séquençage des différents effecteurs vont permettre de connaître la distribution (présence/absence) et la variabilité allélique de ces gènes. La compréhension de la répartition et de la variabilité des effecteurs va ainsi permettre de mieux comprendre les mécanismes d'évolution de ces gènes. Par ailleurs, le séquençage de huit gènes (i) *ghdA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, *gyrB* - gènes de ménage situés sur le chromosome - et (ii) *Egl* et *fliC* - gènes associés à la virulence situés sur le mégaplasme - permettra une analyse de séquence multilocus MLSA ayant pour objectif de reconstituer l'histoire évolutive des différentes souches étudiées (Hanage et al., 2006). Les phylogénies construites à partir de ces huit gènes seront comparées à celle établies sur les gènes associés à l'interaction (i.e. effecteurs) (détection de transferts horizontaux, incongruence phylogénétique, etc.).

Ce stage, s'appuyant sur une démarche expérimentale, est basée sur l'étude des effecteurs impliqués dans la spécificité de virulence sur aubergine, notamment dans la capacité à se multiplier et à se reproduire *in planta*. Après un travail bibliographique, dix ET3 (*RipP1*, *RipP2*, *RipG3*, *RipN*, *RipE1*, *RipAX2*, *RipAJ*, *RipAS*, *RipAZ1* et *RipAU*) (Tableau 3) (Pensec, 2010; Peeters et al., 2014) ont été sélectionnés afin d'étudier



leurs distributions et leur variabilités alléliques dans une collection mondiale de souches. Une étude préliminaire, basée sur la confrontation des données phénotypiques avec des données d'hybridation sur puce à ADN (CGH – *Comparative Genomic Hybridization*) complétées par des tests PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a permis d'identifier une dizaine de gènes bactériens hautement associés à l'avirulence ou à la virulence sur les aubergines résistantes E1<sup>17</sup> et E6. Parmi ces gènes, *RipP2* s'avère être très hautement associé à l'avirulence sur E6, évoquant un cas unique de relation gène-pour-gène chez *R. solanacearum* (Pensec, 2010).

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Matériel biologique

#### 1.1. Matériel végétal

Deux cultivars d'aubergine (*Solanum melongena* L.) sont utilisés dans cette étude : un résistant (E6, accession MM960) et un sensible (E8, accession MM738). MM960 a été créé à l'INRA de Guadeloupe à partir d'un croisement entre une lignée résistante provenant de Turquie et de l'espèce apparentée sauvage *Solanum aethiopicum*. La résistance/sensibilité de ces deux lignées d'aubergine vis-à-vis des différents phylotypes et clades de *R. solanacearum* a été caractérisée durant la thèse d'A. Lebeau (Lebeau, 2010). La lignée MM738, codée E8 lors des essais core-TEP<sup>18</sup> de 2007-2010, a été typée comme sensible aux six pathoprofiles, et présente de forts taux de flétrissement et de colonisation. En revanche, la lignée MM960, codée E6, s'est révélée hautement résistante aux souches des pathoprofiles A, C et D (Lebeau et al., 2011). Des études de cartographie génétique, menées au CIRAD de La Réunion, ont montré que la résistance d'E6 aux souches de phylotype I était conférée par la combinaison d'un gène majeur dominant (*ERsI*) sur le LG2 (Linkage Group 2) et d'un QTL de résistance partielle sur le LG3. La résistance de cette lignée s'est révélée souche-spécifique et complexe. Les souches capables de contourner *ERsI* sont partiellement contrôlées par un autre QTL sur le LG13, ralentissant ainsi la progression des symptômes (Lebeau et al., 2013).

#### 1.2. Collection bactérienne

Une collection mondiale de 91 souches bactériennes représentative de la phylogénie des phylotypes I, II et III a été choisie pour cette étude selon différents critères (Annexe 2) : les souches sont (i) originaires de 13 zones géographiques d'importance agronomique ou d'importance en sélection variétale (Guyane, Côte d'Ivoire, Indonésie, Inde, Martinique, Thaïlande, Australie, Philippines, Taïwan, Burkina Faso, Cameroun, Afrique du Sud et La Réunion), et (ii) isolées principalement sur diverses Solanacées (aubergine, tomate, pomme de terre, poivron/piment.). Elle comprend également des souches virulentes sur l'aubergine sensible E8, et des souches présentant différents profils d'interaction sur l'aubergine résistante E6: (i)

<sup>17</sup> **E1** : cultivar d'aubergine (accession MM853) provenant d'Asie, multiplié par l'INRA et résistante à une large gamme de souches de *R. solanacearum* (Lebeau et al., 2010).

<sup>18</sup> **Core-TEP** : collection de cultivars de tomate-aubergine-piment (Lebeau, 2010).

**Tableau 4.** Localisation et fonctions des huit gènes de ménage présents chez *Ralstonia solanacearum* sélectionnés pour cette étude (Wicker et al., 2012).

Gène	Localisation sur le génome	Domaine fonctionnel ou fonctions
<i>gdhA</i>	chromosome	glutamate déshydrogénase, NADP-spécifique, protéine oxydoréductase
<i>mutS</i>	chromosome	protéine du système de réparation des mésappariements de l'ADN
<i>adk</i>	chromosome	adénylate kinase
<i>leuS</i>	chromosome	leucyl-tARN synthétase
<i>rplB</i>	chromosome	protéine L2 sous-unité 50S ribosomique
<i>gyrB</i>	chromosome	ADN gyrase, sous-unité B
<i>Egl</i>	mégaplasme	précurseur de l'endoglucanase
<i>fliC</i>	mégaplasme	flagelline



capables d'infecter et de faire flétrir E6, (ii) capables d'induire des infections latentes sur E6, ou encore (iii) incapables de coloniser et de faire flétrir E6 (i.e. souches avirulentes).

## 2. Mise en culture des souches et extraction d'ADN

La collection de souches est conservée à -80°C sur des billes microporeuses (tubes Cryobank). Sous la hotte à flux laminaire, deux à trois billes ont été prélevées à l'aide d'une aiguille et placées dans un tube de bouillon nutritif (Annexe 3a). Après 48h d'incubation à 28°C en agitation, 50 µL ont été prélevés et étalés sur milieu Kelman (Annexe 3b) en boîte de Petri selon la technique des « trois secteurs ». Après deux jours d'incubation à 28°C, une colonie isolée a été prélevée et étalée en « pâté » sur milieu Kelman afin de permettre la multiplication bactérienne. Après 24 à 48h d'incubation à 28°C, les bactéries ont été prélevées et mises en suspension ( $10^9$  CFU.mL<sup>-1</sup>) : une anse de 10 µL a été resuspendue dans 1 mL de NaCl 0,5M. La suspension a été centrifugée à 8000 rpm (6000 g) pendant trois minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot bactérien a ensuite été conservé à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN. L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du Wizard® Genomic DNA purification kit (Promega) selon le protocole en annexe 4. La concentration d'ADN extrait et sa qualité ont par la suite été déterminées par spectrophotométrie au NanoDrop® (logiciel ND8000 V2.2.1). Enfin, les ADN bactériens ont été dilués à 2 ng.µL<sup>-1</sup> et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

## 3. Etude génotypique : sélection des gènes de ménage et ET3, amplification par PCR et séquençage

### 3.1. Sélection des gènes de ménage et des amorces PCR

Les gènes à amplifier ont été sélectionnés en fonction de différentes études menées sur (i) le complexe d'espèces *R. solanacearum* (Castillo and Greenberg, 2007, Poussier et al., 2000, Prior and Fegan, 2005), (ii) la phylogénie des espèces du genre *Ralstonia* (Ait Tayeb et al., 2008), ainsi (ii) qu'un schéma MLSA/MLST universel proposé chez les Entérobactéries (Delétoile et al., 2009). Une étude réalisée par Remenant et al. (2010) a permis de déterminer les positions de 13 gènes différents (*adk*, *Egl*, *fliC*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *mutS*, *ppsA*, *pyrG*, *rplB*, *rpoB*, *gapA*, *hrpB*) sur les différents génomes séquencés des souches GMI1000 (phylotype I), CMR15 (phylotype III), CFBP2957 (phylotype IIA), et PSI07 (phylotype IV). Huit gènes, présentant une distance d'au moins 100kb les uns des autres (Harayama and Kasai, 2006), ont été sélectionnés pour cette étude (Wicker et al., 2012). Parmi ces huit gènes, (i) six sont des gènes de ménage situés sur le chromosome : *gdhA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, et *gyrB*, et (ii) deux sont des gènes associés à la virulence situés sur le mégaplasme : *Egl* et *fliC* (Tableau 4). Les couples d'amorces utilisés pour les amplifications PCR sont résumés en annexe 5 (Ait Tayeb et al., 2008, Castillo and Greenberg, 2007, Prior and Fegan, 2005, Wicker et al., 2012).

### 3.2. Sélection des ET3 et définition des amorces PCR

**Tableau 5.** Distribution des 10 gènes ET3 étudiés parmi onze génomes séquencés des phylotypes I, II, III et IV (*Ralstonia* TE3, INRA Toulouse, <https://iant.toulouse.inra.fr/T3E>). Les cases rouges et vertes correspondent respectivement à absence de l'effecteur (0) et présence de l'effecteur (1). Les cases grises signifient qu'un pseudogène de l'effecteur est présent dans la souche, les cases oranges que l'effecteur est présent mais avec un décalage du cadre de lecture (frameshift), et les cases vertes pâles que plusieurs copies de l'effecteur sont présentes dans la souche.

Famille de gène	Effecteur putatif	Phylotype IIB			Phylotype IIA		Phylotype III	Phylotype I		Phylotype IV		
		Molk2	IPO1609	UW551	Po82	CFBP2957	CMR15	GMI1000	RS1000	Psi07	R24	BDB229
RipP1	RSc0826	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
RipP2	RSc0868	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
RipG3	RSp0023	1	1	1	1	1	1	1	1	1		0
RipE1	RSc3369	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1
RipAJ	RSc2101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RipN	RSp1130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
RipAX2	RSp0572	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
RipAS	Rsp1384	1	1	1	1	1	1	1	1		1	
RipAZ1	RSp1582	0	0	0	1	1		1		1		1
RipAU	RSp1460	1	0	0	1	1	1	1		1	1	1

Dix ET3 (*RipP1*, *RipP2*, *RipG3*, *RipN*, *RipE1*, *RipAX2*, *RipAJ*, *RipAS*, *RipAZ1* et *RipAU*) (Tableau 3) ont été sélectionnés pour cette étude. Afin d'amplifier les ET3 par PCR, des couples d'amorces spécifiques doivent être déterminés. Des zones consensus ont alors été recherchées dans des familles d'ET3 pour être certain d'amplifier le gène ciblé dans les différentes souches étudiées. Des familles de gènes orthologues ont été définies à partir des séquences des ET3 présents dans les différents génomes complets et disponibles dans l'interface Web « Ralstonia TE3 » (INRA Toulouse, <https://iant.toulouse.inra.fr/T3E>) (Tableau 5). Afin d'amplifier les zones promotrices et l'ensemble du gène ciblé, des séquences flanquantes (400 nucléotides en 5' et 3' du gène) ont été exportées sous l'interface MaGe (Magnifying Genomes, <http://genoscope.cns.fr/microscope/mage>), sur la plateforme MicroScope. La recherche d'orthologues aux gènes candidats déjà répertoriés sur la plateforme MAGE a été réalisée selon les paramètres suivants : (i) identité entre les gènes supérieure à 80%, et (ii) rapports de recouvrement minimaux (MinLrap) et maximaux (MaxLrap) entre les gènes supérieurs à 90%.

Les séquences des gènes orthologues ont été enregistrées au format fasta et multifasta sous le logiciel Geneious (V5.5; Biomatters; <http://www.geneious.com>). Un alignement des gènes a été ensuite effectué avec le programme d'alignement ClustalW (Thompson, Higgins and Gibson, 1994). Ainsi, les zones consensus ont été identifiées et utilisées pour dessiner les amorces externes (en 5' et 3' du gène). Le fait d'identifier ces zones a permis d'éviter de dessiner les amorces dans les zones polymorphes qui risqueraient de ne pas être amplifiées par la suite. Pour certains gènes de grande taille tels que *RipAS* (~2500 pb), plusieurs couples d'amorces ont été définies afin de permettre l'amplification en plusieurs parties. Au total, 27 paires d'amorces ont été déterminées en ciblant les températures de fusion ( $T_m$ ) proches de 60°C et les tailles de 18 à 25 nucléotides (Annexe 6a).

### 3.3. Amplifications des ET3 et gènes de ménage par PCR

L'ADN de toutes les souches a été soumis à l'amplification PCR via l'utilisation des amorces spécifiques des ET3 et des gènes de ménage. Différents mix ont été préparés selon le dosage présenté en annexe 7a, auxquels ont été rajoutés 2  $\mu$ L d'ADN. Les amplifications par PCR ont été répétées au moins deux fois pour tester la reproductibilité des amplifications. De plus, si aucune amplification n'a été obtenue avec les amorces externes, les souches ont été resoumises une nouvelle fois à l'amplification PCR avec des amorces internes dessinées pour cette étude ou utilisées précédemment (Pensec, 2010; N'Guessan, 2012) (Annexe 6b). Tous les produits PCR ont été séchés dans un concentrateur d'ADN (SpeedVac ADN) avant d'être envoyés à séquencer à Beckman-Coulter Genomics (Takeley, Royaume-Uni).

### 3.4. Analyse des séquences nucléiques et construction d'arbres phylogénétiques

Une fois le séquençage des produits PCR réalisé, les séquences simples brins, disponibles sous forme d'électrophorégramme, ont été téléchargées sur l'interface Web de Beckman-Coulter. L'assemblage des deux brins a été effectué à l'aide du logiciel Geneious : chaque séquence assemblée est contrôlée et



**Figure 6.** Disposition des plants d'aubergine dans le rotoplan et méthode d'inoculation de *Ralstonia solanacearum*: (a) les terrines contenant des plants inoculés avec des souches différentes sont isolées par des sacs plastiques, (b) scarification des racines au scalpel, (c) : ajout de 5 mL de suspension bactérienne en surface du substrat de culture des plants (Photos : L. Sujeeun).

éditée manuellement. Toutes les séquences ambiguës (défaut d'alignement des brins Forward et Reverse, taux de mésappariement trop important) ont été systématiquement réamplifiées puis reséquencées. Les séquences consensus ont ensuite été enregistrées sous format multifasta puis alignées via ClustalW (Thompson, Higgins and Gibson, 1994) sous Geneious. L'alignement des séquences brutes avec des séquences de référence des différents génomes séquencés de *R. solanacearum* (souches GMI1000, RS1000, CMR15, IPO1609, MOLK2 et CFBP2957) a permis d'ajuster ces séquences dans le bon cadre de lecture. Les extrémités des séquences ont ensuite été coupées (« trim ») en fonction de la qualité des séquences et du cadre de lecture de chaque gène (N'Guessan et al, 2012; Wicker et al., 2012) afin d'obtenir des séquences finales de tailles identiques. Les séquences nucléiques finales ont été traduites en séquences protéiques et des arbres phylogénétiques ont été construits pour chaque gène ET3 par la méthode Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) (modèle de substitution Jukes Cantor) avec 1000 bootstraps sous Geneious et édités sous FigTree (V1.4, BEAST, <http://tree.bio.ed.ac.uk>). Les séquences nucléiques finales des huit gènes de ménage ont été concaténées selon les positions de chaque gène dans les différents génomes séquencés (Remenant et al., 2010; Wicker et al., 2012). Le concaténât a été exporté sous le logiciel FastTree (V2.1.7, MicrobesOnline, <http://www.microbesonline.org/fasttree/>) afin de permettre la construction de l'arbre phylogénétique par la méthode Maximum Likelihood (ML) (Guindon and Gascuel, 2003) (modèle de substitution nucléotidique GTR+CAT) puis son édition sous FigTree.

#### 4. Phénotypage de souches représentatives de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine E6/E8

Parmi la collection bactérienne choisie pour cette étude, 48 souches n'avaient pas été phénotypées sur aubergine précédemment au laboratoire. Vingt souches ont été sélectionnées pour une inoculation en conditions contrôlées (NS2) sur des plants d'aubergine résistants E6/sensibles E8 afin d'observer les différents types d'interaction : avirulence, colonisation sans symptôme, flétrissement de la plante.

##### 4.1. Dispositif expérimental et méthode d'inoculation

Les graines d'aubergines ont été semées en serre quatre semaines avant inoculation et une semaine après le semis, les plantules ont été repiquées en pots. Au stade 3-4 feuilles, les plants, placés sur un plateau, ont été transférés en chambre climatique (rotoplan) trois jours avant inoculation afin qu'ils s'acclimatent aux conditions de la chambre : humidité à 90%, température de 30°C le jour et 24°C la nuit et photopériode de 12h. Chaque combinaison souche x cultivar a été testée sur deux répétitions de 10 plants placées dans une même terrine. Dans chaque sous jardinière, sont placées deux terrines contenant des plants inoculés par la même souche afin d'éviter les contaminations croisées. Si cela n'est pas possible, chaque terrine est isolée à l'aide d'un sac plastique (Figure 6a).

Les bactéries ont été mises en culture une semaine avant inoculation selon le même protocole décrit au point 2 du chapitre matériels et méthodes. Pour chaque souche, et pour une inoculation de 40 plants, l'amas bactérien obtenu a été étalé en pâte sur cinq boîtes de milieu Kelman. Après 48 heures d'incubation à





**Figure 7.** Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sur aubergine (Photo : M. Gouy in A. Lebeau, 2010). Les notations 0 à 4 correspondent respectivement à : aucun symptôme; une feuille flétrie, deux ou trois feuilles flétries, toutes les feuilles flétries, et tige pliée (Coupat-Goutaland et al, 2011; Lebeau et al., 2011).

**Tableau 6.** Liste des six mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* fournis par le LIPM (Laboratoire des Interactions Plant-Microorganismes) de Toulouse.

Mutants simples	Effecteur putatif	Famille de gène	Résistance	Publié	Milieu de culture
GMI1658	RSc0826	RipP1	Spectinomycine	oui	Kelman + Spectinomycine 40mg.L <sup>-1</sup>
GRS100	RSc0868	RipP2	Gentamycine	oui	Kelman + Gentamycine 10mg.L <sup>-1</sup>
GRS417	RSp0028	RipG3	Spectinomycine	oui	Kelman + Spectinomycine 40mg.L <sup>-1</sup>
GRS103	RSc3369	RipE1	Gentamycine	oui	Kelman + Gentamycine 10mg.L <sup>-1</sup>
GRS412	RSc2101	RipAJ	Gentamycine	non	Kelman + Gentamycine 10mg.L <sup>-1</sup>
GRS216	RSc1815	RipTAL	Gentamycine	oui	Kelman + Gentamycine 10mg.L <sup>-1</sup>

28°C, les pâtes ont été prélevés jusqu'à obtention d'une suspension titrée à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> dans 250mL de tampon Tris (0,01M Trizma, pH=7,1). L'inoculation a été réalisée par ajout de 5mL d'inoculum en surface du substrat de culture des plants après scarification des racines au scalpel (Figure 6b et 6c).

#### 4.2. Suivi d'incidence du flétrissement bactérien

La notation des symptômes a été réalisée à partir du quatrième jour après inoculation, puis tous les deux-trois jours en évaluant chaque plante selon l'échelle de notation de 0 à 4 (Figure 7) : 0 : aucun symptôme; 1 : une feuille flétrie; 2 : deux ou trois feuilles flétries; 3 : toutes les feuilles flétries; 4 : tige pliée (Coupat-Goutaland et al., 2011; Lebeau et al., 2011) Une plante notée 1 ou 2 correspond à une plante asymptomatique et une plante notée 3 ou 4 à une plante flétrie. Pour tous les plants asymptomatiques, une recherche d'infection latente a été effectuée à la fin de l'expérience. Les échantillons de tige ont été désinfectés en surface par de l'éthanol à 70° et stérilisés par trempage dans de l'éthanol à 95° avant d'être flambés. Afin de permettre la libération des bactéries des tissus vasculaires, des sections de 2 cm ont été coupées à chaque extrémité de la tige, et le fragment restant a été dilacéré et mis à macérer 15 minutes dans 5 mL de tampon Tris. Puis, 50 µL de chaque macérât ont été étalés en trois secteurs sur milieu semi-sélectif Sequeira modifié (Annexe 3c), à raison de deux réplicats par macérât. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 28°C pendant deux à trois jours. Les plants asymptomatiques ont été notés comme positifs à une infection latente lorsque les colonies bactériennes isolées présentaient une morphologie caractéristique de *R. solanacearum*.

### 5. Phénotypage de mutants d'effecteurs de la souche GMI1000

Six mutants défectifs (*RipP1*, *RipP2*, *RipG3*, *RipAJ*, *RipE1* et *RipTAL*) (Tableau 6), fournis par Neemo Peeters du LIPM (Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes) de Toulouse, ont également été inoculés sur aubergine E6 et E8, pour estimer leur implication dans l'avirulence sur E6. La progression cinétique *in planta* et la charge bactérienne des mutants ont ensuite été comparées à celles de la souche sauvage GMI1000 et un test d'induction de la réaction d'hypersensibilité (HR) par les mutants d'effecteur a aussi été réalisé.

#### 5.1. Dispositif expérimental et méthode d'inoculation

Les tests de pathogénicité ont eu lieu en chambre climatique dans un local de Niveau de Sécurité 3 (NS3) en raison de l'utilisation de souches mutantes. Chaque combinaison souche x cultivar a été testée sur deux répétitions de 15 plants placées dans une même terrine. Les plantes ont été inoculées de la même façon qu'au point 4.1 du chapitre matériel et méthodes : pour chaque souche et pour une inoculation de 110 plantes, les pâtes bactériens ont été prélevés jusqu'à l'obtention d'une solution titrée à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> dans 600mL de tampon Tris.



**Figure 8.** Méthode d'inoculation par injection : la suspension bactérienne est injectée délicatement à l'aide d'une seringue sans aiguille, en maintenant la face supérieure de la feuille avec du papier essuie-tout (Photo : L. Sujeeun).



## 5.2. Test de charge bactérienne et suivi d'incidence du flétrissement bactérien

Afin d'estimer la charge bactérienne des souches mutantes et sauvage, 5 plants sensibles E8 et 5 plants résistants E6 de chaque souche ont été prélevés pendant une semaine après l'inoculation (5 prélèvements correspondant respectivement à deux, trois, quatre, cinq et sept jours après inoculation). Des fragments de tige d'environ 2 cm ont été pesés de manière à exprimer la concentration bactérienne en CFU par gramme de matière fraîche. Après macération des tiges dans 2 mL de tampon Tris, deux dilutions ( $10^{-2}$  et  $10^{-4}$ ) ont été réalisées dans du tampon Tris à partir des solutions mères. 50  $\mu$ L de chaque solution ont ensuite été étalés sur milieux spécifiques aux mutants (Annexe 3d et 3e) à l'aide de l'ensemencement automatique easySpiral® Pro (InterScience, Angers). La numération bactérienne a été effectuée après 48 à 72 heures d'incubation à 28°C en dénombrant manuellement les colonies à l'aide d'une grille de comptage Spiral standard placée sous la boîte ensemencée selon les recommandations du fournisseur.

Le suivi d'incidence s'est réalisé de la même façon qu'au point 4.2 du chapitre matériels et méthodes. Au bout de 28 jours, toutes les plantes ont été prélevées afin de détecter des infections latentes.

## 5.3. Test d'induction de la réaction d'hypersensibilité (HR) par les mutants d'effecteurs

### 5.3.1. Inoculation et suivi des symptômes

L'inoculation des souches a été réalisée sur trois plants adultes (P1, P2 et P3) par cultivar (E6 et E8). Sur trois feuilles de chaque plant, huit injections ont été réalisées correspondant aux six souches mutantes, à la souche sauvage GMI1000 et au témoin négatif (Tris) (Figure 8). Les symptômes ont été évalués à quatre dates de notation : 24, 48, 72 et 84 heures après inoculation. Les phénotypes observés sur feuille ont été formalisés à l'aide d'une échelle de notation à 10 notes, inspirée de l'échelle de chlorose/nécrose développée par Wroblewski et al. (2009) (Annexe 8).

### 5.3.2. Estimation de la colonisation des feuilles

Une HR réelle empêche la progression de l'agent pathogène à l'endroit où il a pénétré dans la plante. Pour valider le lien entre symptômes de nécrose et HR, un prélèvement à proximité de chaque zone d'injection a été effectué 84 heures après inoculation. Chaque échantillon de feuille a été découpé à l'aide d'un emporte pièce métallique de 1 cm de diamètre et dilacéré dans 5mL de Tris. Ensuite, 50  $\mu$ L de chaque suspension ont été étalés en trois secteurs sur milieux de culture spécifiques aux mutants. Après 48 heures d'incubation à 28°C, la présence de colonies caractéristiques de *R. solanacearum* a été notée sur chaque boîte.

## 6. Analyse des données

### 6.1. Typologie : identification des groupes de répertoires d'effecteurs

Après criblage PCR, les répertoires en effecteurs des différentes souches ont été établis en fonction de la présence ou de l'absence des 10 gènes ciblés. Pour chaque gène putatif, les profils de répartition

**Tableau 7.** Polymorphisme de taille des 10 effecteurs au sein de 78 souches de la collection bactérienne soumises à l'amplification PCR. Les différentes notations 0 à 3 correspondent à : 0 : absence de l'effecteur; 1 : présence de l'effecteur à la longueur attendue; 2 à 3 : présence de l'effecteur à une taille différente de celle attendue.

Origine géographique	Numéro RUN	Phylotype	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipAX2	RipN	RipAU	RipAZ1	RipAS	Phénotype sur E6
Philippines	47	I	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
La Réunion	58	IIA	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
La Réunion	59	IIB	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0
Taiwan	85	I	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	NA
Afrique du Sud	104	I	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	NA
Afrique du Sud	106	I	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	NA
Afrique du Sud	108	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Cameroun	145	III	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Cameroun	147	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	4
Cameroun	150	IIA	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	NA
Taiwan	155	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	NA
Taiwan	156	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Australie	158	I	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	NA
Taiwan	159	I	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	NA
Martinique	353	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Martinique	356	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
La Réunion	523	III	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
La Réunion	657	III	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Martinique	811	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
La Réunion	928	IIB	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	3
La Réunion	941	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	4
Indonésie	994	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	996	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	NA
Thaïlande	997	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	999	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	NA
Inde	1002	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Inde	1008	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Inde	1013	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1029	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	1032	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	1039	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1040	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Thaïlande	1042	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1047	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1050	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1109	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1114	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Martinique	1143	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1216	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1234	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1240	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1251	I	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	NA
Côte d'Ivoire	1533	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1538	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1539	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1546	I	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	3.1
Côte d'Ivoire	1739	I	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2
Côte d'Ivoire	1740	I	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1743	I	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1747	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	4
Côte d'Ivoire	1753	IIA	0	1	1	1	1	1	0	3	1	0	5
Côte d'Ivoire	1756	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3.2
Côte d'Ivoire	1761	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	4
Côte d'Ivoire	1762	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	1
Côte d'Ivoire	1771	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1792	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
Côte d'Ivoire	1793	III	1	1	1	0	1	1	1	1	2	1	2
Côte d'Ivoire	1802	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1854	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1861	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	1
Côte d'Ivoire	1867	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1884	IIA	1	0	1	1	1	0	0	3	1	0	1
Côte d'Ivoire	1898	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1900	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
Côte d'Ivoire	1916	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1924	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Guyane	1947	IIB	1	1	0	1	1	0	2	2	1	0	3,2
Guyane	1966	IIB	1	1	1	1	1	0	2	2	1	0	2
Guyane	1976	IIB	0	1	1	1	1	1	0	2	1	2	2
Guyane	1984	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	NA
Guyane	1986	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Guyane	1987	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Guyane	1992	IIB	1	1	0	1	1	0	2	2	1	0	2
Guyane	1994	IIA	1	1	0	1	1	3	0	2	1	1	2
Guyane	2004	IIB	1	1	0	1	1	0	0	2	1	0	2
Guyane	2174	I	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	NA
Guyane	2175	I	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	NA
Guyane	2176	I	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	NA

d'effecteurs ont été codés de la façon suivante : 0 : absence d'amplification; 1 : amplification – fragment de la taille attendue; 2 et 3 : amplification – fragment de taille différente de celle attendue.

Chaque souche est ainsi décrite par un profil de 10 variables (gènes) pouvant prendre quatre états différents. A l'aide du logiciel R v.2.26 et 3.0.1 (R Development Core Team, 2010), une classification hiérarchique ascendante des souches de la collection entière a été réalisée en fonction de la présence/absence/polymorphisme des effecteurs. Les notes associées à la présence/absence/polymorphisme des effecteurs sont transformées en variables nominales. Une souche ayant un effecteur dont la longueur est différente de celle attendue n'est pas plus proche, a priori, d'une souche ayant l'allèle attendu qu'une souche n'ayant pas cet effecteur. Le calcul de la dissimilarité est effectué par « simple matching », rapport de concordance (fonction daisy et module cluster), et la classification hiérarchique ascendante utilise la méthode de Ward pour la construction du dendrogramme (fonction agnes).

## **6.2. Distinction des valeurs des taux de flétrissement, taux de colonisation et typologie phénotypique des souches**

De précédentes analyses réalisées sur les interactions core-TEP/coreRs2 (en considérant les taux de flétrissement et de colonisation) ont permis de déterminer cinq groupes phénotypiques de référence notés de 1 à 5 : 1 : hautement résistant; 2 : moyennement résistant; 3,1 : partiellement résistant; 3,2 : infection latente; 4 : moyennement sensible; et 5 : hautement sensible (Lebeau et al., 2011). Ainsi, dans cette étude, en se basant sur les taux de flétrissement et de colonisation finaux, chaque combinaison souche-cultivar d'aubergine a été assignée à un phénotype de référence en utilisant « la méthode des plus proches voisins » (fonction knn et module class) sous le logiciel R. L'effet du facteur « souche » et « cultivar » sur l'incidence de flétrissement et la colonisation a été testé en utilisant respectivement un modèle linéaire généralisé (glm) avec un test du  $\chi^2$  (chi-square) au seuil critique de 5% et avec une analyse de variance (ANOVA) au seuil critique de 5%. L'incidence de flétrissement et la moyenne de colonisation ont été comparées en utilisant un test de comparaison multiple des moyennes basé sur la méthode de Tukey au seuil de 5% afin de différencier les souches deux à deux (fonction glht et module multcomp).

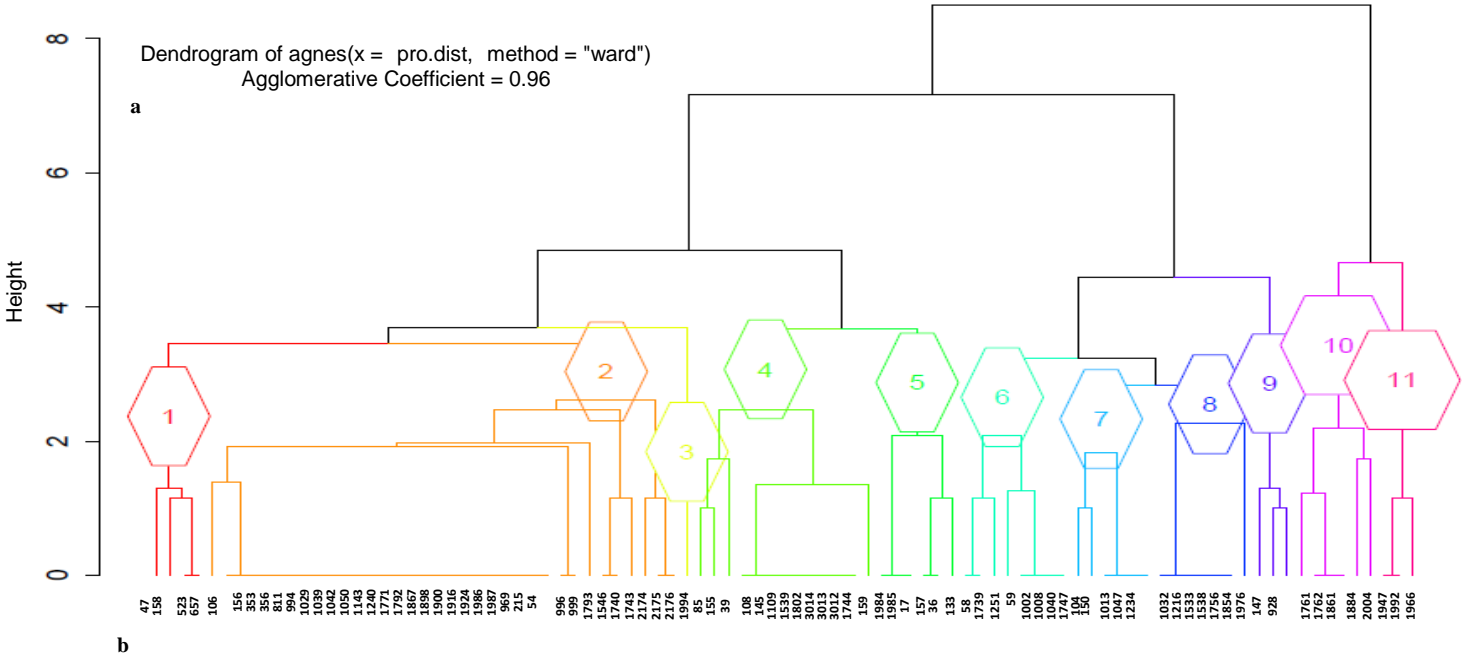
## **RESULTATS**

### **1. Etude géotypique : présence et polymorphisme des gènes ciblés et analyses phylogénétiques**

Les protocoles PCR utilisés ont parfois été modifiés lorsque les amplifications entraînaient l'apparition de bandes aspécifiques lors des révélations sur gel d'agarose. Pour accroître la spécificité d'appariement des amorces, les températures d'hybridation et le nombre de cycles PCR ont donc été augmentés ou diminués jusqu'à obtenir des protocoles optimisés (Annexe 7b). Pour quelques souches, certains couples d'amorces externes n'ont permis d'amplifier qu'un fragment du gène (soit en 5', soit en 3') : les amorces internes ont donc été utilisées dans ce cas.

**Tableau 8.** Présence (1)/absence(0) des 10 effecteurs au sein des (i) neuf génomes des souches de *Ralstonia solanacearum* nouvellement séquencées par le laboratoire et (ii) quatre génomes de référence des phylotypes I (GMI1000 ou RUN54), IIA (CFBP2957ou RUN36), IIB (CFBP6783 ou RUN17) et III (CMR15 ou RUN133). Les notations 0 et 1 correspondent à : 0 : absence de l'effecteur; et 1 : présence de l'effecteur. La case grise signifie que seulement un pseudogène de l'effecteur est présent dans la souche.

Origine géographique	Numéro RUN	Phylotype	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipAX2	RipN	RipAU	RipAZ1	RipAS	Phénotype sur E6
La Réunion - Vallon	3014	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Infections latentes sur E6
La Réunion - Vallon	3013	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Virulence E8
La Réunion - Vallon	3012	I	1	0	1	1	1	1	1		1	1	Virulence E8
Taiwan	157	I	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	Virulence E6
Thaïlande	969	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Virulence E6
Guyane	1985	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	Virulence E6
Burkina Faso	39	III	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	Virulence E6
Côte d'Ivoire	1744	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	Avirulence E6
Cameroun	215	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Avirulence E6
Guyane	54	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Avirulence E6
Martinique	36	IIA	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	Virulence E6
Martinique	17	IIB	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	Avirulence E6
Cameroun	133	III	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	Virulence E6



	Groupe										
Effecteur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RipP1	2	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1
RipP2	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
RipG3	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1
RipE1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RipAJ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RipAX2	1	1	1	1	1	0	1	2	0	0	0
RipN	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2	1
RipAU	1	1	1	1	1	0	1	1	3	2	1
RipAZ1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
RipAS	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1

**Figure 9. (a)** Classification hiérarchique ascendante des 91 souches de *Ralstonia solanacearum* selon leur répertoire d'effecteurs (présence/absence/polymorphisme) : distinction de 11 groupes. **(b)** Caractérisation des groupes en fonction des effecteurs qu'ils contiennent. Les différentes notations 0 à 3 correspondent à : 0 : absence de l'effecteur; 1 : présence de l'effecteur à la longueur attendue; 2 à 3 : présence de l'effecteur à une longueur différente à celle attendue.

Ainsi, les informations disponibles dans cette étude ne sont données que pour les couples d'amorces pour lesquels l'amplification s'est révélée positive. Cependant, pour certains effecteurs tels que *RipAJ*, *RipN*, *RipAS* et *RipAZI*, les données de quelques souches ne portent que sur un fragment du gène (i.e, soit le fragment 5', soit 3') et pas sur l'ensemble du gène (Annexe 9).

### 1.1. Mise en évidence de la présence et du polymorphisme des gènes étudiés dans la collection bactérienne

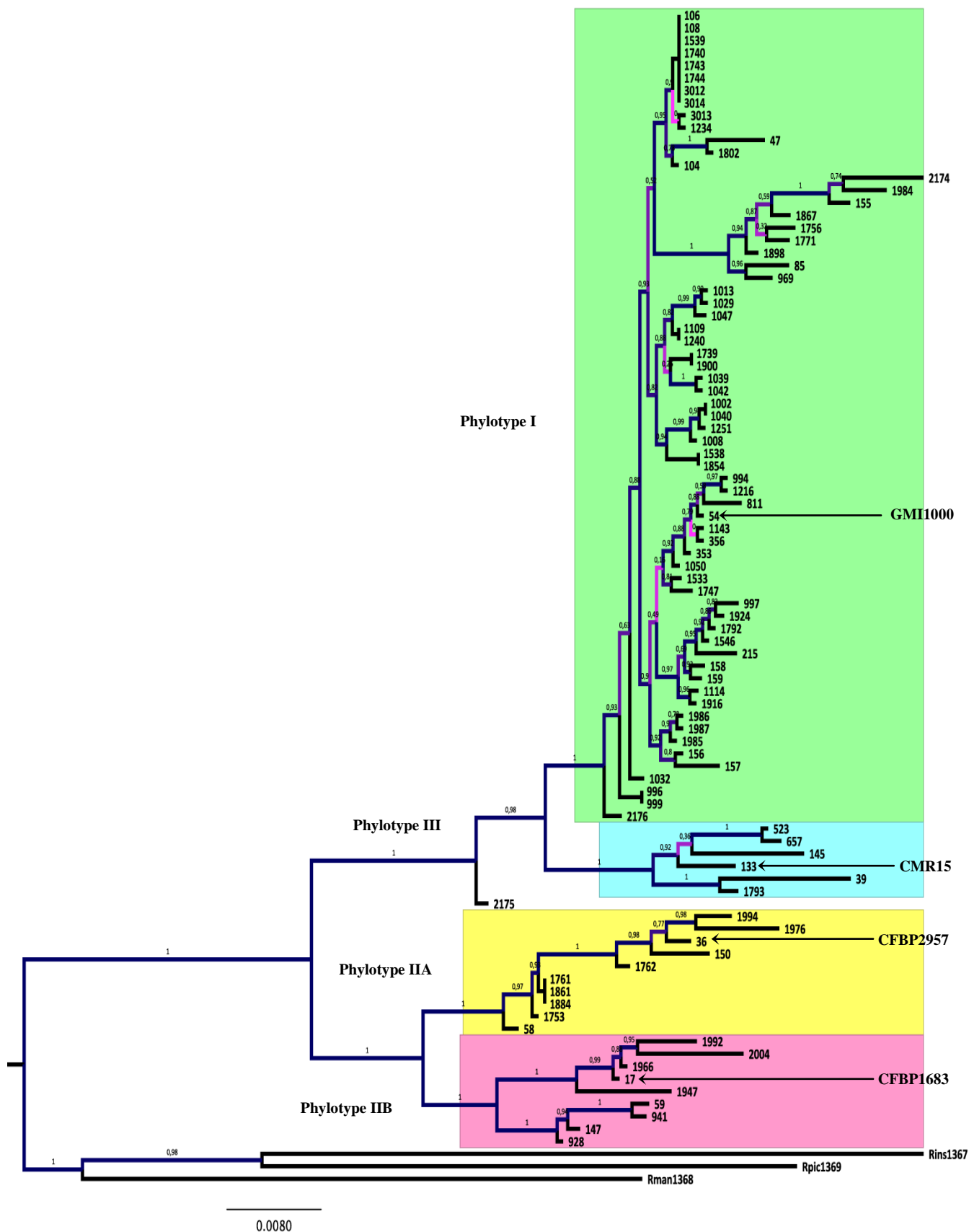
L'évaluation de la présence/absence des gènes candidats ciblés au sein de la collection bactérienne permet de comprendre la distribution des effecteurs. *RipAJ* est le seul effecteur présent chez toutes les souches et *RipE1* est présent chez toutes les souches sauf pour RUN1793 et RUN39. Les autres effecteurs (*RipP1*, *RipP2*, *RipG3*, *RipN*, *RipAZI*, *RipAU*, *RipAX2* et *RipAS*) sont présents dans un nombre plus restreint de souches (Tableau 7 et 8).

Lors de l'amplification des effecteurs candidats, un certain polymorphisme de taille a pu être détecté (Tableau 7 et 8). Ce polymorphisme est dû à certains couples d'amorces qui permettent d'amplifier des fragments de tailles différentes selon les souches. C'est le cas de *RipAU*, pour lequel la longueur attendue était de 1106pb et des amplifications ont pu être observées à 1800pb pour certaines souches et 1950pb pour d'autres. Un polymorphisme de taille est aussi observé pour tous les autres gènes sauf pour *RipP2* et *RipE1*.

### 1.2. Réalisation des répertoires d'effecteurs et lien avec le phylotype des souches

Une analyse multivariée a permis de regrouper les souches selon leur répertoire d'effecteurs afin de pouvoir choisir des souches représentatives de la diversité du contenu en effecteurs pour l'inoculation (i.e. test phénotypage sur E6). En tenant compte de la présence/absence des effecteurs de chaque souche et du polymorphisme observé, 11 groupes ont été identifiés pour leur représentativité de la diversité et leur relative homogénéité en contenu d'effecteurs (Figure 9). La classification obtenue montre que le groupe 3 est le seul groupe contenant une seule souche avec un répertoire d'effecteurs différents des autres : RUN1994. Les groupes 1, 8 et 5 ont le même contenu en effecteurs mais sont séparés à raison du polymorphisme de taille des gènes observés. Quant aux groupes 9 et 10, ils regroupent des souches au contenu en effecteurs pratiquement opposé au groupe 2 (mis à part les gènes présents chez toutes les souches) : les gènes absents des groupes 9 et 10 sont présents dans le groupe 2. Le groupe 6 regroupe les souches possédant le moins d'effecteurs par rapport aux autres groupes : les souches sont en effet caractérisées que par la présence de *RipE1*, *RipAJ* et *RipAS*. Ainsi, cette distinction en plusieurs groupes va permettre de vérifier si les souches contenues dans ces différents groupes engendrent des phénotypes contrastés.

Les groupes de souches définis selon leur contenu en effecteurs peuvent être comparés aux groupes phylogénétiques (Annexe 10). Les groupes définis associent en général des souches de plusieurs



**Figure 10.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Maximum-likelihood (modèle de substitution GTR+CAT), basé sur le concaténat des séquences nucléiques des huit gènes de ménage (*gdhA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, *gyrB*, *Egl* et *fliC*) de 91 souches de *Ralstonia solanacearum*. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). L'arbre a été enraciné avec les séquences des huit gènes de ménage des souches de *R. mannitolylitica* (Rman 1368), *R. insidiosa* (Rins 1367) et *R. pickettii* (Rpic1369). Les cadres surlignés en rose, jaune, bleu et vert correspondent aux souches appartenant respectivement aux phylotypes IIB, IIA, III et I. Les flèches indiquent les souches de référence des phylotypes I (GMI1000), IIA (CFBP1683), IIB (CFBP2957) et III (CMR15).

phylotypes : les groupes 1, 2 et 4 regroupent des souches de phylotype I, et une à trois souches de phylotypes III. Le groupe 3 ne comprend que de la souche RUN1994, phylotype IIA, et les groupes 6, 7 et 8 contiennent des souches de phylotype I avec une à deux souches de phylotypes IIA et IIB. Le groupes 9 est strictement composés que de souches de phylotype IIB et le groupe 10 de souches IIA et une souche IIB. Enfin le groupe 5 présente une composition particulière puisqu'il regroupe des souches de phylotypes I, et les souches référence des phylotypes IIA, IIB et III.

### 1.3. Analyses phylogénétiques des arbres générés par la MLSA et les ET3

Le séquençage des huit gènes de ménage permet une analyse de séquence multilocus MLSA afin de reconstituer la phylogénie de l'ensemble des souches étudiées. L'arbre phylogénétique obtenu permet, dans l'ensemble, de répartir les souches dans quatre grands groupes représentés par les phylotypes I, IIA, IIB et III (Figure 10). Le groupe phylotype III est divisé en deux sous-groupes selon l'origine géographique des souches : (i) un groupe composant les souches d'Afrique de l'Ouest (RUN1793 et 39) (ii) et un autre regroupant les souches de l'Afrique centrale (RUN133 et 145) en plus des deux souches originaire de La Réunion (RUN523 et 657). Le groupe phylotype IIB est composé de deux sous-groupes avec des souches d'origine différente : Martinique et Guyane pour un groupe, et La Réunion et Cameroun pour l'autre. Le groupe phylotype IIA est aussi divisé en deux sous-groupes contenant des souches de diverses origines. Le groupe phylotype I permet de distinguer globalement trois grands groupes et quelques souches basales (isolées) telles que RUN1032, 996, 999 et 2176. Néanmoins, la majorité des souches du groupe phylotype I présente des longueurs de branche très courtes et ne sont pas forcément regroupées selon leur origine géographique. La souche RUN2176 faisant partie du phylotype I, se retrouve à l'extérieur du groupe.

Le séquençage des différents effecteurs permet l'analyse de la variabilité allélique de ces gènes. Les arbres phylogénétiques de seulement cinq effecteurs ont été retenus pour cette étude, les autres étant en cours d'analyse : *RipP1*, *RipP2*, *RipE1*, *RipN* et *RipAU* (Annexe 12). Par exemple, pour *RipP1*, la plupart des souches de phylotype I se regroupent de la même façon que la phylogénie engendrée par la MLSA. Les souches RUN3012, 3013, et 3014, toutes de phylotype I, sont regroupés dans la même branche que CFBP6783, souche de référence du phylotype IIB, ce qui n'est pas observé chez la phylogénie MLSA. Pour *RipP2*, l'arbre se divise principalement en quatre grands groupes : trois groupes composés de souches essentiellement de phylotype I, et un dernier groupe composé de souches appartenant au phylotype I, IIA et IIB. Quant à *RipE1*, l'arbre obtenu est composé de (i) cinq grands groupes contenant des souches spécifiques au phylotype I, (ii) un groupe avec seulement des souches de phylotypes IIB, et (iii) un autre groupe qu'avec des souches IIA. Ce regroupement est aussi observé sur l'arbre phylogénétique MLSA. L'arbre obtenu pour *RipN* présente une variabilité allélique beaucoup plus importante que les autres effecteurs. De plus, la majorité de souches de phylotype I sont regroupées avec leur souche de référence

**Tableau 9.** Pathogénicité et phénotype de virulence sur cultivar E6 des 20 souches de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I sur aubergine, estimés par les indices de flétrissement et de colonisation finaux.

Origine géographique	Numéro RUN	Répertoires d'effecteurs	Cultivar E6 <sup>x</sup>			Cultivar E8 <sup>x</sup>
			Flétrissement <sup>y</sup>	Colonisation <sup>y</sup>	Phénotype <sup>z</sup>	Flétrissement <sup>y</sup>
Philippines	47	1	0 ± 0,0 ab	25 ± 21,2 ab	2	80 ± 14,1 ab
Afrique du Sud	104	7	0 ± 0,0 ab	15 ± 7,1 ab	1	10 ± 0,0 c
Afrique du Sud	106	2	0 ± 0,0 ab	0 ± 0,0 ab	1	30 ± 0,0 abc
Afrique du Sud	108	4	40 ± 14,1 ab	50 ± 14,1 ab	3,1	35 ± 49,5 abc
Australie	158	1	5 ± 7,07 ab	10 ± 14,1 ab	1	55 ± 21,2 abc
Indonésie	969	2	60 ± 28,2 ab	70 ± 14,1 ab	4	5 ± 7,1 c
Thaïlande	997	2	5 ± 7,1 ab	10 ± 14,1 ab	1	75 ± 21,2 ab
Inde	1002	6	20 ± 0,0 ab	30 ± 0,0 ab	2	95 ± 7,1 a
Inde	1029	2	62 ± 21,2 ab	70 ± 28,3 ab	4	65 ± 35,3 abc
Thaïlande	1032	8	0 ± 0,0 ab	20 ± 0,0 ab	2	85 ± 21,2 a
Indonésie	1050	2	0 ± 0,0 ab	10 ± 0,0 ab	1	10 ± 0,0 c
Indonésie	1114	7	5 ± 7,1 ab	15 ± 21,2 ab	1	90 ± 14,1 a
Indonésie	1240	2	20 ± 14,1 ab	25 ± 21,2 ab	2	100 ± 0,0 abc
Guyane	1987	2	20 ± 14,1 ab	40 ± 42,3 ab	2	25 ± 7,1 bc
Guyane	2174	2	70 ± 0,0 b	70 ± 0,0 b	4	85 ± 21,2
Guyane	2175	2	45 ± 35,3 ab	60 ± 28,3 ab	4	70 ± 28,3
Guyane	2176	2	40 ± 0,0 ab	50 ± 0,0 ab	3,1	55 ± 7,1 abc
La Réunion	3012	4	25 ± 7,1 ab	35 ± 7,1 ab	2	75 ± 21,2 ab
La Réunion	3013	4	10 ± 0,0 a	15,7 ± 7,1 a	1	45 ± 21,2 abc
La Réunion	3014	4	20 ± 14,1 ab	45 ± 21,2 ab	2	95 ± 7,1 a

E6 et E8 correspondent respectivement aux cultivars résistant et sensible.

<sup>y</sup> Moyennes ± écart-types de deux réplicats (10 plants chacun). Flétrissement correspond au pourcentage moyen final de plants flétris, Colonisation correspond au taux de plants asymptomatiques flétris et colonisés sur le nombre total de plants. Les valeurs suivies des mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (Tukey test, P = 0,05).

<sup>z</sup> Le nombre assigné à chaque souche correspond au score phénotypique défini par la combinaison de l'incidence de flétrissement et le taux de colonisation finaux et calculé selon Lebeau et al. (2013) (1 = très résistant, 2 = moyennement résistant, 3,1 = partiellement résistant, 4 = moyennement sensible). Le phénotype obtenu sur E8 n'a pu être calculé, du fait de l'absence des données de colonisation.

**Tableau 10.** Pathogénicité et phénotypes de virulence des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine, estimés par les indices de flétrissement et de colonisation finaux.

Souches	Cultivar			
	E6 <sup>x</sup>			E8 <sup>x</sup>
	Flétrissement <sup>y</sup>	Colonisation <sup>y</sup>	Phénotype <sup>z</sup>	Flétrissement <sup>y</sup>
GMI1000	NA	NA	NA	NA
Δ-RipP1	0 ± 0,0 a	20,8 ± 5,9 a	2	43,3 ± 14,1 a
Δ-RipP2	16,7 ± 11,8 a	16,7 ± 0,0 a	2	66,7 ± 11,8 a
Δ-RipG3	NA	NA	NA	NA
Δ-RipE1	0 ± 0,0 a	4,16 ± 5,9 a	1	56,6 ± 23,6 a
Δ-RipAJ	0 ± 0,0 a	4,16 ± 5,9 a	1	86,7 ± 0,0 a
Δ-RipTAL	4,16 ± 5,9 a	20,8 ± 5,9 a	2	50 ± 4,7 a

<sup>x</sup> E6 et E8 correspondent respectivement aux cultivars résistant et sensible.

<sup>y</sup> Moyennes ± écart-types de deux réplicats (12 plants E6 et 15 plants E8 chacun). Flétrissement correspond au pourcentage moyen final de plants flétris, Colonisation correspond au taux de plants asymptomatiques flétris et colonisés sur le nombre total de plants. Les valeurs suivies des mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (Tukey test, P = 0,05).

<sup>z</sup> Le nombre assigné à chaque souche correspond au score phénotypique défini par la combinaison de l'incidence de flétrissement et le taux de colonisation finaux et calculé selon Lebeau et al. (2013) (1 = très résistant, 2 = moyennement résistant). Le phénotype obtenu sur E8 n'a pu être calculé, du fait de l'absence des données de colonisation.



(GMI1000 ou RS1000), et un groupe ne contenant spécifiquement que des souches de phylotype III est observé. Enfin, l'arbre obtenu pour RipAU montre un groupe spécifique au phylotype III, et le reste des souches se répartissent de façon très variable quel que soit le phylotype.

## 2. Etude phénotypique : taux de flétrissement et taux de colonisation des souches inoculés

Compte tenu des restrictions spatiales liées à l'utilisation d'un local NS2, uniquement 20 souches ont été sélectionnées pour les tests de phénotypage. Ces souches, toutes de phylotype I, ont été choisies parmi les 11 groupes définis pour représenter d'une part la diversité des origines géographiques et d'autre part la diversité des répertoires d'effecteurs (Annexe 11). L'utilisation du cultivar E8 sensible permet de repérer les souches très peu virulentes et de vérifier l'agressivité des autres souches. Cependant, seules les données de flétrissement ont été prises en compte dans cette étude, du fait de l'absence de données de colonisation.

L'incidence de flétrissement et le taux de colonisation ne sont pas significativement différents entre les deux répétitions ( $P = 0.209$  et  $0.365$ , respectivement), les analyses ont ainsi été basées sur les résultats moyens (Tableau 9). D'après les pourcentages de flétrissement moyens finaux, sept souches parmi les 20 inoculées semblent être agressives sur E8 en présentant des pourcentages supérieurs à 85. La souche RUN1240 est la seule qui a provoqué 100% de flétrissement sur les plantes E8. Trois souches (RUN 969, 108 et 1050) sont considérées comme très peu agressives sur E8 étant donné le faible pourcentage de flétrissement engendré (moins de 20%). Cependant, les valeurs de flétrissement de RUN969 et 108 sont plus élevées chez le cultivar E6 résistant que chez E8 sensible. Chez le cultivar résistant E6, les souches RUN969, 1029, 2174 et 2175 ont provoqué des taux de flétrissement supérieurs à 50% ainsi que des taux de colonisation importants. De plus, le score phénotypique associé à ces souches est le plus élevé : 4 (moyennement sensible). Les autres souches montrent de faibles taux de flétrissement, ont peu colonisé E6 et sont associées à des scores phénotypiques qualifiés de « résistant » de 1, 2 et 3,1 (respectivement très, moyennement et partiellement résistant).

## 3. Etude phénotypique des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*

### 3.1. Taux de flétrissement, taux de colonisation et charge bactérienne

Pour le cultivar E8, seules les données de flétrissement ont été prises en compte dans cette étude, du fait de l'absence des données de colonisation. L'incidence de flétrissement et le taux de colonisation ne sont pas significativement différents entre les deux répétitions ( $P = 0,536$  et  $0.388$ , respectivement), les analyses ont ainsi été basées sur les résultats moyens (Tableau 10). Cependant, les données obtenues pour GMI1000 et  $\Delta$ RipG3 ne sont pas exploitables dans cette étude suite à la perte de plusieurs plants parmi les deux répétitions. D'après les pourcentages de flétrissement moyens finaux chez le cultivar sensible E8, le mutant  $\Delta$ RipAJ présentent le pourcentage le plus élevé (supérieur à 85) et  $\Delta$ RipP1, le pourcentage le plus faible (inférieur à 50). Chez le cultivar résistant E6, aucun flétrissement et un faible taux de colonisation sont

**Tableau 11.** Concentration bactérienne finale (CFU.g<sup>-1</sup>) des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*.

Souches	Concentration bactérienne (CFU.g <sup>-1</sup> )	
	Cultivar E6	Cultivar E8
GMI1000	2,62.10 <sup>6</sup>	1,56.10 <sup>7</sup>
Δ-RipP1	4,00.10 <sup>6</sup>	6,06.10 <sup>6</sup>
Δ-RipP2	3,89. 10 <sup>6</sup>	1,53.10 <sup>7</sup>
Δ-RipG3	0	6,33. 10 <sup>6</sup>
Δ-RipE1	1,16. 10 <sup>6</sup>	1,29. 10 <sup>9</sup>
Δ-RipAJ	0	7,53. 10 <sup>8</sup>
Δ-RipTAL	1,44. 10 <sup>6</sup>	9,00 10 <sup>8</sup>

observés pour les mutants  $\Delta\text{RipE1}$  et  $\Delta\text{RipAJ}$ , et il en est de même pour leur score phénotypique : 1 (très résistant).  $\Delta\text{RipP2}$  et  $\Delta\text{RipTAL}$  présentent de faibles taux de flétrissement et colonisation et ont un score phénotypique associé à 2 (moyennement résistant). Quant à  $\Delta\text{RipP1}$ , aucun flétrissement mais une faible colonisation a été observé chez le cultivar E6, et il est aussi associé au score phénotypique 2. Les données manquantes pour la souche sauvage GMI1000 ne permettent pas comparer avec les résultats obtenus pour les différents mutants.

Les concentrations bactériennes ont été calculées pour chaque prélèvement, mais seules les concentrations finales ont été prises en compte dans cette étude (Tableau 11). Les résultats de charge bactérienne obtenus par dénombrement des colonies sur boîtes restent homogènes dans l'ensemble. Chez le cultivar E6, les mutants d'effecteurs présentent pratiquement les mêmes concentrations bactériennes que la souche sauvage : ils sont tous à  $10^6$  CFU.g<sup>-1</sup>, sauf pour  $\Delta\text{RipG3}$  et  $\Delta\text{RipAJ}$  qui ont des concentrations nulles. Le cultivar E8 montre des concentrations bactériennes plus élevées que sur E6 pour toutes les souches sauf  $\Delta\text{RipP1}$  qui a sensiblement la même concentration chez E6. Avec ces résultats sensiblement similaires entre eux, il est difficile de déterminer l'agressivité des mutants par rapport à la souche sauvage GMI1000.

### 3.2. Corrélation entre notations de nécrose et colonisation

Les différences les plus marquées ont été observées à 72 heures après inoculation. Les symptômes observés à 84 heures sont les mêmes observés à 72 heures après inoculation. Globalement, les réactions observées sont plus importantes sur E8 sensible que sur E6 résistant, sauf pour le mutant  $\Delta\text{RipTAL}$  qui montre une réaction plus importante sur E6 que sur E8. Le type sauvage GMI1000 montre une absence nette de HR, et une colonisation seulement sur le cultivar E8 sensible. Visuellement les souches mutantes  $\Delta\text{RipP1}$ ,  $\Delta\text{RipP2}$ ,  $\Delta\text{RipG3}$ ,  $\Delta\text{RipAJ}$  et  $\Delta\text{RipE1}$  réagissent de la même façon : pas de réaction à 48 heures, puis une forte réaction à 72 heures (Figure 11 et Tableau 12).  $\Delta\text{RipP1}$ ,  $\Delta\text{RipP2}$  et  $\Delta\text{RipG3}$  provoquent (i) une forte réaction sur E8 et (ii) une chlorose sévère sur E6, et colonisent la feuille avec un taux de colonisation allant de 50 à 100% : ces souches provoqueraient plutôt une chlorose/nécrose sans HR (Tableau 12 et Figure 12). Une faible colonisation est observée sur E6 pour  $\Delta\text{RipAJ}$  et il en est de même sur E8 pour  $\Delta\text{RipE1}$ . Aucun cas de réaction faible (notation 1 ou 2) avec une forte colonisation n'a été observé.

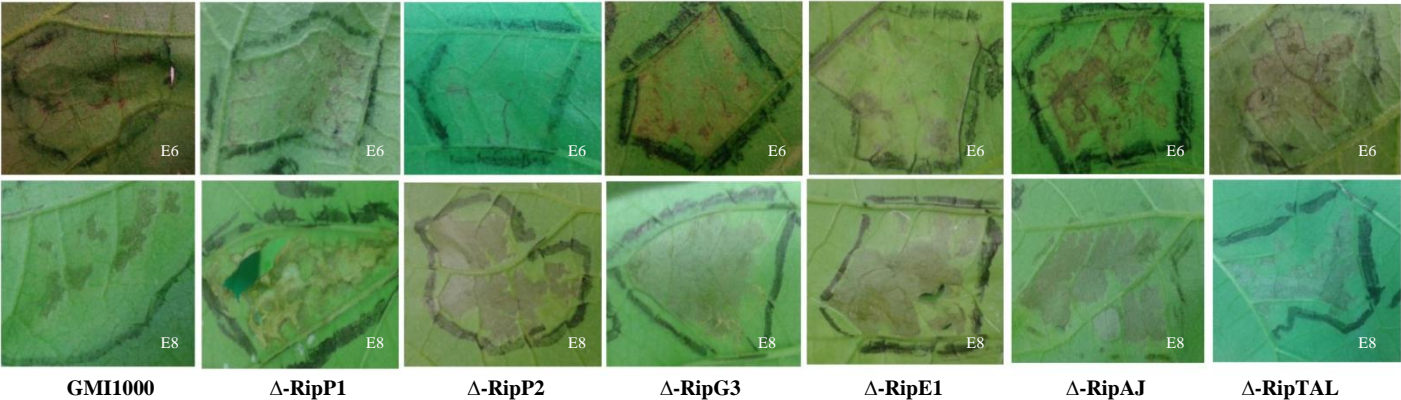
## DISCUSSION

### 1. Approche évolutive : détermination des répertoires d'effecteurs et analyses phylogénétiques

#### 1.1. La distribution des effecteurs se structure en 11 profils

Cette étude permet de comprendre la répartition des ET3 au sein d'une large gamme de souche phylogénétiquement diverses et dont certaines proviennent d'une même zone géographique. Un effecteur ( $\text{RipAJ}$ ) a été retrouvé chez toutes les souches avec un allèle différent pour une seule souche (RUN159),

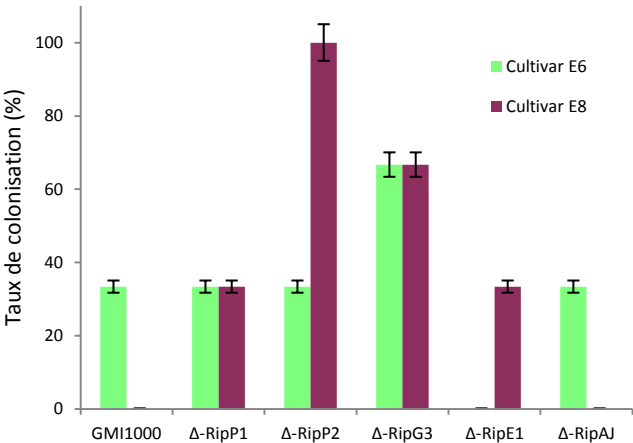
**Figure 11.** Symptômes finaux observés sur feuilles d’aubergine E6/E8 à 84 heures après inoculation des mutants d’effecteurs et de la souche sauvage GMI1000.



**Tableau 12.** Notations des symptômes finaux observés sur feuilles d’aubergine E6/E8 84 heures après inoculation des mutants d’effecteurs et de la souche sauvage GMI1000.

Souches	Présence/absence des effecteurs						Symptômes <sup>a</sup>	
	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipTAL	Cultivar E6	Cultivar E8
GMI1000	1	1	1	1	1	1	3*	7
Δ-RipP1	0	1	1	1	1	1	4	9
Δ-RipP2	1	0	1	1	1	1	3*	9
Δ-RipG3	1	1	0	1	1	1	5	9
Δ-RipE1	1	1	1	0	1	1	5	9
Δ-RipAJ	1	1	1	1	0	1	5	9
Δ-RipTAL	1	1	1	1	1	0	6	4

<sup>a</sup> : les notations correspondent aux symptômes finaux, observés à 84 heures après inoculation  
\* symptôme observé sur seulement un réplicat



**Figure 12.** Taux de colonisation final (en %) (84 heures après inoculation) sur aubergine E6/E8 la souche sauvage GMI1000 et des souches mutantes d’effecteurs de GMI1000 de *Ralstonia solanacearum*. Les taux de colonisation obtenus pour Δ-RipTAL sont de 0% et ne sont donc pas présentés sur le graphe.

RipE1 et RipP2 ne présentent aucun polymorphisme parmi les souches chez lesquelles ils sont présents et le reste des effecteurs ont une distribution variable selon les souches. Cette variabilité est également notée par Guidot et al. (2007) via une analyse sur puce 5K dans laquelle l'ensemble des effecteurs connus chez la souche GMI1000 ont été testés.

Une variabilité dans la distribution des effecteurs était donc un résultat attendu et la détection du polymorphisme de taille des effecteurs constitue un volet exploratoire de cette étude. Ce polymorphisme a notamment été observé lors du design d'amorces : pour certains, effecteurs, après alignement des gènes orthologues, il a été difficile de trouver des zones consensus (i.e. des zones conservées dans l'ensemble du gène). Après amplification des gènes par PCR, du polymorphisme de longueur a aussi été détecté, particulièrement pour certains effecteurs de grande taille (RipAU, RipAZ1 et RipAS). Ces variations de taille suggèrent la présence de séquences insertionnelles (IS) (~1000pb), ou des duplications en tandems, (de 25 à 250 pb) ou des mutations ponctuelles pouvant altérer la fonction des ET3 et modifier le phénotype de certaines souches. Ces variations de taille dues à des réarrangements génomiques ont déjà été rapportées chez les effecteurs de (i) *R. solanacearum* (Lavie et al., 2004), et (ii) différentes espèces de *Xanthomonas* (Hajri et al., 2009).

Ce criblage a donc permis de déterminer le répertoire d'effecteurs (parmi 10 effecteurs candidats) de chacune des souches de la collection bactérienne. La classification de ces souches a permis de mettre en évidence 11 groupes représentatifs des profils observés parmi lesquels 20 souches ont été sélectionnées pour les inoculations. Cependant, cette approche a quand même quelques limites : (i) le séquençage des souches ne peut se faire que sur des effecteurs présents dans les souches, (ii) la présence/absence des effecteurs est déterminée par l'amplification PCR. Cette dernière ne sera pas effective si un gène est trop polymorphe (i.e. pas d'hybridation des amorces PCR sur la cible). Dans ce cas pour révéler la présence du gène, des hybridations par Dot Blot seraient nécessaires (Hajri et al., 2009).

## 1.2. Les analyses phylogénétiques révèlent des cas d'incongruence

Les résultats de comparaison des arbres MLSA et ET3 montrent quelques cas d'incongruence phylogénétique. Concernant les arbres générés pour les effecteurs RipE1 et RipN, les souches sont réparties de la même façon que sur l'arbre MLSA, et ne montre ainsi aucune incongruence phylogénétique : ces deux gènes semblent avoir une évolution concomitante à celles des gènes de ménage (Annexe 12c et d). L'arbre phylogénétique de RipP1 montre une incongruence phylogénétique avec l'arbre MLSA : les souches RUN3012, 3013 et 3014 (phylotype I) sont placées avec des souches de phylotypes IIB sur l'arbre RipP1 (Annexe 12a). De même pour RipP2, le dernier groupe sur l'arbre regroupe des souches de phylotypes I, IIA et IIB, ce qui n'est pas observé sur l'arbre MLSA (Annexe 12b). Enfin le regroupement des souches chez RipAU est complètement différent de l'arbre MLSA. Ces différents cas d'incongruences suggèrent ainsi des événements de recombinaison. L'existence d'évènements de recombinaison et leur localisation pourraient être envisagées via l'utilisation logiciel RDP (Martin et al., 2010).



L'analyse de la répartition des souches sur l'arbre phylogénétique engendré par la MLSA, déterminé à partir des séquences des huit gènes de ménage suggère que la recombinaison est présente à l'intérieur et entre phylotypes. L'exemple de la souche RUN 2175 se trouvant à l'extérieur du groupe I phylotype donne en effet l'impression d'être recombinant. De plus, la structure en réticulation suppose une recombinaison à l'intérieur des gènes ou entre les gènes. Des calculs d'indices d'homoplasie permettraient de confirmer l'hypothèse de recombinaison et par la suite une détection d'évènements de recombinaison pourrait être réalisée sur l'ensemble des gènes alignés et concaténés (Wicker et al., 2012).

Dans l'ensemble, l'outil MLSA ne met pas vraiment en évidence une structuration des souches selon leur origine géographique puisque des souches de même phylotype, proches géographiquement, ne sont pas forcément toujours regroupées sur l'arbre phylogénétique généré par la MLSA. De plus, la longueur des branches relativement courte signifie que les dissimilarités nucléotidiques entre souche sont très faibles. La topologie en étoile de l'arbre, particulièrement pour le groupe phylotype I laisse supposer qu'il s'agit d'un groupe très jeune en expansion. Ces résultats confirment ceux obtenus sur une collection mondiale de souches de *R. solanacearum* mettant en évidence le phylotype I comme un groupe évolutif en expansion et hautement recombinant (Wicker et al., 2012). Cette hypothèse pourrait être validée en étudiant la généalogie par coalescence afin de quantifier le taux de recombinaison dans le but de mettre en évidence les signatures moléculaires de l'histoire démographique de l'organisme (équilibre, expansion, etc.).

## 2. Approche fonctionnelle : bilan sur l'inoculation des mutants d'effecteurs de la souche GMI1000 et des tests HR

Dans l'ensemble, les résultats de cinétique et d'incidence obtenus sur les mutants ne sont pas exploitables. Les résultats des tests d'induction de la HR obtenus ne restent pas très clairs : globalement, (i) les réactions observées sont plus importantes sur E6 résistant que E8 sensible, (ii) une absence de HR nette est observée sur le type sauvage GMI1000, et (iii) les symptômes de nécrose sont plus importants par inoculation de cinq mutants ( $\Delta$ RipG3,  $\Delta$ RipE1,  $\Delta$ RipAJ,  $\Delta$ RipP1 et  $\Delta$ RipTAL) par rapport à la souche sauvage GMI1000 et équivalent pour le mutant restant  $\Delta$ RipP2. Ces différentes observations laissent à penser que les effecteurs RipG3, RipE1, RipAJ, RipP1 et RipTAL pourraient être reconnus par les gènes impliqués dans les mécanismes de défense de la plante et ralentiraient ainsi l'infection du cultivar E6. Leur inactivation par mutagenèse permettrait donc au pathogène d'échapper à la reconnaissance de la plante. Ce répertoire d'effecteurs pourrait être reconnu par les mécanismes de la plante conduisant à la résistance durable de l'aubergine E6. Ces résultats suggèrent que la résistance à *R. solanacearum* chez E6 fait intervenir de multiples mécanismes d'interaction entre la plante et le pathogène et vont à l'encontre d'une simple interaction gène-pour-gène suivant le modèle proposé par Flor (1971). Cependant ces observations sont à l'opposé de ce qui a été observé par Pensec en 2010. En effet, ses résultats suggéraient fortement une





interaction du type gène-pour-gène et RipP2 avait été montré comme l'effecteur étant le plus associé à l'avirulence sur aubergine E6.

Concernant les résultats obtenus sur l'aubergine sensible E8, l'ensemble des mutants donne une réaction équivalente comparée à celle obtenue par la souche sauvage GMI1000 excepté pour le mutant  $\Delta$ RipTAL qui conduit à des symptômes très atténués. Cet effecteur RipTAL pourrait ainsi participer à l'agressivité de la souche GMI1000 sur aubergine E8. D'autres études réalisées chez *Xanthomonas* ont montré que les Tal-effecteurs peuvent contribuer à l'agressivité sur plante. Ces résultats sont ainsi en accord avec ceux de cette étude (Bai et al., 2000; Yang and White, 2004).

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Une grande masse de résultats a été acquis lors de ce stage, qu'il sera important d'analyser de façon plus approfondie. Les inoculations réalisées en NS3 sur les mutants seraient à répéter afin de récupérer les données manquantes et de comparer les résultats à ceux obtenus dans cette. Il en serait de même pour les tests de phénotypage sur E6, les données de colonisation sur E8 permettraient de compléter le jeu de données flétrissement/colonisation/phénotype afin de valider la virulence ou avirulence des souches étudiées sur le cultivar résistant E6 et sensible E8.

La suite de l'analyse des arbres phylogénétiques des cinq effecteurs restants (RipG3, RipN, RipAS, RipAZ1 et RipAJ) vont permettre de vérifier si les différences phénotypiques observées parmi les souches s'expliquent par du polymorphisme de séquence d'un effecteur particulier ou bien si cet effecteur n'a pas d'effet majeur dans la virulence de la bactérie. Ces analyses permettront aussi permettre d'identifier les effecteurs sous sélection en déterminant le rapport de mutations non synonymes et le nombre de mutations synonymes afin de savoir si les effecteurs sont sous sélection diversifiante, ou purificatrice (ce qui aurait un rôle important dans la pathogénicité).

L'hypothèse d'un biais méthodologique lié à l'organe inoculé n'est pas à exclure pour les tests d'induction de HR. En effet, en conditions réelles, le dialogue moléculaire entre *R. solanacearum* et sa plante-hôte débute au niveau racinaire, et non dans les feuilles. Cependant, des tests d'inoculation de *R. solanacearum* sur feuille ont déjà été réalisés avec succès, notamment pour des études de compétition bactérienne in planta (Macho et al., 2010; Solé et al., 2012). Il serait ainsi intéressant d'étudier de plus près la compartimentation des réactions de résistance au sein de la plante : il se peut que la plante ne développe pas la même panoplie d'éléments de détection au niveau de ses organes aériens. Dons des essais de corrélation entre réponse racinaire et réponse foliaire seront à envisager. De plus, la méthodologie d'inoculation sur feuilles devra également être revue afin d'éviter les biais au faible nombre de répétitions. Afin d'augmenter le nombre de répétitions, l'idéal serait d'inoculer une souche par plant avec une à deux infiltrations par feuille, et ce sur quatre feuilles minimum. De plus, les injections devraient plutôt se réaliser



loin de la nervure principale et de préférence en bout de feuille. Ainsi la variabilité de réaction en fonction de l'âge et de la position des feuilles pourra être observée. Les prélèvements pour les tests de colonisation devraient plutôt s'effectuer entre la zone d'infiltration et la nervure principale. Des échantillons supplémentaires pourraient être aussi prélevés au niveau du pétiole, au-dessus du collet ou encore à l'apex afin de tenter d'évaluer la cinétique de progression de l'agent pathogène au sein de la plante. Afin de limiter de le biais d'observateur, il serait intéressant de mettre en place une méthode de quantification qui ne soit pas basé sur le diagnostic visuel. Enfin, il serait intéressant de comparer les résultats obtenus des tests HR en étudiant l'effet de chaque effecteur ciblé (ou les plus importants) par la technique d'expression transitoire dans un vecteur *Agrobacterium* : cette approche a été réalisée sur plus de 140 effecteurs de *P. syringae* et *R. solanacearum* et a permis d'identifier des répertoires impliqués dans la spécificité d'hôtes (Wroblewski et al. 2009)

## Références bibliographiques

- Abecassis, J., Bergez, J.E., 2009. Les semences et la création variétale, in: Abecassis, J., Bergez, J.E. (Eds.), Les filières céréalières. Organisation et nouveaux défis. Quae, Paris, pp. 29-46.
- Ait Tayeb, L., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., Grimont, P.A.D., 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res Microbiol.* 159, 169-177.
- Alfano, J.R., Collmer, A., 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 385-414.
- Andrison, D., 1995. Nomenclature for pathogenicity and virulence: precision vs. tradition. *Phytopathology* 85, 518-519.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., Genin, S., 2006. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 14620-14625.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J.C., Pernollet, J.C., Boucher, C.A., 1994. PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 13, 543-553.
- Bai, J.F., Choi, S.H., Ponciano, G., Leung, H., Leach, J.E., 2000. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1, 1322-1329.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., Dangl, J.L., 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog.* 7:e1002132. doi: 10.1371/journal.ppat.1002132.
- Bart, R., Cohn, M., Kassen, A., McCallum, E.J., Shybut, M., Petriello, A., Krasileva, K., Dahlbeck, D., Medina, C., Alicai, T., Kumar, L., Moreira, L.M., Rodrigues Neto, J., Verdier, V., Santana, M.A., Kositcharoenkul, N., Vanderschuren, H., GUISSEM, W., Bernal, A., Staskawicz, B.J., 2012. High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:E1972-1979. doi: 10.1073/pnas.1208003109.
- Bent, A.F., Mackey, D., 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399-436.
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Briere, C., De Wit, P.J., Marco, Y., Deslandes, L., 2008. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for *RRS1-R*-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20, 2252-2264.

Bertolla, F., Frostegard, A., Brito, B., Nesme, X., Simonet, P., 1999. During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 467-472.

Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J., Van Gijsegem, F., 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20, 681-683.

Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S., 1999. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 31, 237-251.

Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S., 2002. A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. *Mol. Plant-Microbe In.* 15, 109-119.

Boucher, C.A., Barberis, P.A., Trigalet, A.P., Demery, D.A., 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131, 2449-2457.

Bousset, L., Brun, H., Chèvre, A.M., Delourme, R., 2011. Quel lien entre l'épidémiologie, la création variétale et le potentiel de durabilité des résistances ? Illustration chez le phoma du colza. *Innovations Agronomiques* 15, 29-43.

Buddenhagen, I.W., Sequeira, L., Kelman, A., 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.

Buddenhagen, I., Kelman, A., 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2, 203-230.

Burdon, J.J., 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31, 305-323.

Buttner, D., Nennstiel, D., Klusener, B., Bonas, U., 2002. Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 184, 2389-2398.

Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C.R., Campanile, F., Almeida, N.F., Studholme, D.J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J.C., Morales-Lizcano, N.P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C.L., Leman, S., Vinatzer, B.A., 2011. The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog.* 7:e1002130. doi:10.1371/journal.ppat.1002130.

Carney, B.F., Denny, T.P., 1990. A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level. *J. Bacteriol.* 172, 4836-4843.

Castillo, J.A., Greenberg, J.T., 2007. Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microb.* 73, 1225-1238.

Claridge, M.F., den Hollander, J., 1983. The biotype concept and its application to insect pest

of agriculture. Crop Prot. 2, 85-95.

Coll, N.S, Valls, M., 2013. Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. Mibrob. Biotechnol. 6, 614-620.

Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D., and Alfano, J. 2002. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. Trends Microbiol 10, 462-469.

Collmer, A., Schneider, D., Lindeberg, M., 2009. Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens. Plant Physiol. 150, 1623-1630.

Cook, D., Barlow, E., Sequeira, L., 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2, 113-121.

Cook, D., Sequeira, L., 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. Centre for Agricultural Bioscience International, Wallingford, pp. 77-93.

Cooper, J.E., Feil, E.J., 2004. Multilocus sequence typing - what is resolved? Trends Microbiol. 12, 373-377.

Cornelis, G.R., 2006. The type III secretion injectisome. Nat. Rev. Microbiol. 4, 811-825.

Coupat, B., Chaumeille-Dole, F., Fall, S., Prior, P., Simonet, P., Nesme, X., Bertolla, F., 2008. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. FEMS Microbiol. Ecol. 66, 14-24.

Coupat-Goutaland, B., Bernillon, D., Guidot, A., Prior, P., Nesme, X., Bertolla, F., 2011. *Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation. Mol. Plant-Microbe Interact. 24, 497-505.

Cruickshank, I.A.M., 1963. Phytoalexins. Annu. Rev. Phytopathol. 1, 351-374.

Cui, H., Xiang, T., Zhou, J.M., 2009. Plant immunity: A lesson from pathogenic bacterial effector proteins. Cell. Microbiol. 11, 1453-1461.

Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S., 2004. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Mol. Microbiol. 53, 115-128.

Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B.H., Russell, A.B., Martin, G.B., Collmer, A., 2011. Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108, 2975-2980.

Dajoz, R., 2012. Sélection naturelle et sélection artificielle, in: Aubert, A. (Ed.), L'évolution biologique au XXIe siècle: les faits, les théories. Lavoisier, Paris, pp. 51-76.

Debert, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreksal, M., Rivière, P., Vigné, F., Laplace, D., Lebreton, L., Wicker, E., 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge on the “emerging ecotype”. *Phytopathol.* 104,586-596.

Delétoile, A., Decré, D., Courant, S., Passet, V., Audo, J., Grimont, P., 2009. Phylogeny and identification of *Pantoea* species and typing of *Pantoea agglomerans* strains by multilocus gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 47, 300-310.

Denancé, N., 2011. Rôle de la paroi végétale dans l'interaction entre *Arabidopsis thaliana* et *Ralstonia solanacearum* : criblage de mutants "paroi" et caractérisation fine de la résistance accrue du mutant walls are thin 1 (wat1). Thèse de Doctorat de l'Université Toulouse III-Paul Sabatier. 189 pages.

Denny, T., Carney, B., Schell, M., 1990. Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol. Plant-Microbe In.* 3, 293-300.

Denny, T.P., 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species, in: Gnanamanickam, S.S.(Ed.), *Plant-Associated Bacteria*. Springer Publishing, Dordrecht, pp. 573-644.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., Marco, Y., 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2404-2409.

Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y., 2003. Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8024-8029.

Fegan, M., Holoway, G., Hayward, A.C., Timmis, J., 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype, in Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.), *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. INRA Edition, Paris, pp. 34-43.

Fegan, M., Prior, P., 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* complex”?, in: Allen, C., Prior, P., Hayward, A. (Eds.), *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. American Phytopathological Society Press, Minnesota, pp. 449-461.

Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.

Gabriel, D.W., Allen, C., Schell, M., Denny, T.P., Greenberg, J.T., Duan, Y.P., Flores-Cruz, Z., Huang, Q., Clifford, J.M., Presting, G., González, E.T., Reddy, J., Elphinstone, J., Swanson, J., Yao, J., Mulholland, V., Liu, L., Farmerie, W., Patnaikuni, M., Balogh, B., Norman, D., Alvarez, A., Castillo, J.A., Jones, J., Saddler, G., Walunas, T., Zhukov, A. & Mikhailova, N., 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 69-79.

Genin, S., Boucher, C., 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 107-134.

Genin, S., 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol.* 187, 920-928.

Genin, T.P., Denny, S., 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 67-89.

Gillings, M., Fahy, P., Davis, C., 1993. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 44-48.

Gillings, M.R., Fahy, P., 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Centre for Agricultural Bioscience International, Wallingford, pp. 95-112.

Greenberg, J.T., and Vinatzer, B.A., 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr Opin Microbiol* 6, 20-28.

Guidot, A., Prior P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S. & Boucher, C., 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* 189, 377-387.

Guidot, A., Coupat, B., Fall, S., Prior, P., Bertolla, F., 2009a. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME J.* 3, 549-562.

Guidot, A., Elbaz, M., Carrère, S., Siri, M.I., Pianzzola, M.J., Prior, P., Boucher, C., 2009b. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99, 1105-1112.

Guttman, D.S., Vinatzer, B.A., Sarkar, S.F., Ranall, M.V., Kettler, G., and Greenberg, J.T., 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* 295, 1722-1726

Hacker, J., Carniel, E., 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 2, 376-381.

Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., Poussier, S., 2009. A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 4:e6632. doi: 10.1371/journal.pone.0006632.

Hanage, W.P., Fraser, C., Spratt, B.G., 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 1917-1927.

Hayward, A.C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65-87.

Hayward, A.C., 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Centre for Agricultural Bioscience International, Wallingford, pp. 9-24.



Hogenhout, S., Van der Hoorn, R., Terauchi, R., Kamoun, S., 2009. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 115-122.

Janse, J.D., Schans, J., 1998. Experiences with the diagnosis and epidemiology of bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in The Netherlands. *Bulletin OEPP* 28, 65-67.

Jeong Y., Cheong, H., Choi, O., Kim, J.K., Kang, Y., Kim, J., Lee, S., Koh, S., Moon, J.S., Hwang, L., 2011. An HrpB-dependent but type III-independent extracellular aspartic protease is a virulence factor of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant Pathol.* 12, 373-380.

Jones, J., Dangl, J., 2006. The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.

Kelman, A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693-695.

Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., Boucher, C., 2002 PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 1058-1068.

Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., Leung, H., 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 187-224.

Lebeau, A., 2010. Résistances de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. Thèse de Doctorat de l'Université de La Réunion. 178 pages.

Lebeau, A., Daunay, M.C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker E., Prior, P., 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101, 154-165.

Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M.C., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., Frary, A., Dintinger, J., 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126, 143-158.

Lefeuvre, P., Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., Prior, P., Constraints on genome dynamics revealed from gene distribution among the *Ralstonia solanacearum* species. *PLoS One* 8:e63155. doi: 10.1371/journal.pone.0063155.

Li, Z., Wu, S., Bai, X., Liu, Y., Lu, J., Liu, Y., Xiao, B., Lu, X., Fan, L., 2011. Genome sequence of the tobacco bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J. Bacteriol.* 193, 6088-6089.

Lin, Y.M., Chou, I.C., Wang, J.F., Ho, F.I., Chu, Y.J., Huang, P.C., Lu, D.K., Shen, H.L., Elbaz, M., Huang, S.M., Cheng, C.P., 2008. Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21, 1261-1270.

Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A., 2012. *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. Trends Microbiol. 20, 199-208.

Macho, A.P., Guidot, A., Barberis, P., Beuzon, C.R., Genin, S., 2010. A Competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. Mol. Plant-Microbe In. 23, 1197-1205.

Manners, J.G., 1993. Principles of Plant Pathology, second ed. Press Syndicate of the University of Cambridge, New York.

Marryat, D.C.E., 1907. Notes on the infection and histology of two wheats immune to the attacks of *Puccinia glumarum*, yellow rust. J. Agric. Sci. 2, 129-138.

Martin, D. Rubicki, E, 2010. RDP: detection of recombination amongst align sequences. Bioinformatics, 26, 2662-2643.

Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13, 614-629.

McDonald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 40, 349-379.

Miller, M.B., Bassler, B.L, 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165-199.

Morange, M., 2000. Gene function. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie 323, 1147-1153.

Morin, Emilie, 2011. Résistance de l'aubergine au flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*): cartographie génétique de la résistance de MM195 et caractérisation phénotypique de l'interaction Ers1/popP2. Rapport de stage, deuxième année ingénieur agronome, Montpellier SupAgro. 69 pages.

Moury, B., Fabre, F., Montarry, J., Janzac, B., Ayme, V., Palloix, A., 2010. L'adaptation des virus de plantes aux résistances variétales. Virologie 14, 227-239.

Mysore, K.S., Ryu, C.M., 2004. Non-host resistance: how much do we know? Trends Plant Sci. 9, 97-104.

Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H., Gojobori, T., 2004. Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. Nat. Genet. 36, 760-766.

N'guessan, A.C., 2012. Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al. (1995) [Burkholderiaceae], agent du flétrissement bactérien en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan. 251 pages.

N'Guessan, C.A., Abo, K., Fondio, L., Chiroleu, F., Lebeau, A., Poussier, S., Wicker, E., Koné, D., 2012. So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. Bacteriology 102, 733-740.

Noël, L., Thieme, F., Nennstiel, D., Bonas, U., 2001. cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Mol. Microbiol. 41, 1271-1281.

Nurnberger, T., Lipka, V., 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. Mol. Plant Pathol. 6, 335-345.

O'Brien, H.E., Thakur, S., Guttman, D.S., 2011. Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective. Annu. Rev. Phytopathol. 49, 269-289.

Occhialini, A., Cunnac, S., Reymond, N., Genin, S. & Boucher, C., 2005. Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. Mol Plant Microbe Interact 18, 938-949.

O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., Isberg, R.R., 2011. Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 14733-14740.

Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.C., Genin, S., 2014. Répertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. BMC Genomics 14:859. doi: 10.1186/1471-2164-14-859.

Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., Valls, M., 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. Mol. Plant Pathol. 14, 651-662.

Pensec, F., 2010. Exploration des facteurs génétiques liés à la spécificité de virulence de *Ralstonia solanacearum* sur aubergine et tomate. Rapport Master 2. Angers SupAgro. 35 pages.

Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000. Proc Natl Acad Sci USA. 99, 7652-7657.

Ponciano, G., Ishihara, H., Tsuyumu, S., Leach, J., 2003. Bacterial effectors in plant disease and defense: keys to durable resistance? Plant Dis. 87, 1272-1282.

Potnis, N., Krasileva, K., Chow, V., Almeida, N.F., Patil, P.B., Ryan, R.P., Sharlach, M., Behlau, F., Dow, J.M., Momol, M., White, F.F., Preston, J.F., Vinatzer, B.A., Koebnik, R., Setubal, J.C., Norman, D.J., Staskawicz, B.J., Jones, J.B., 2011. Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper. BMC Genomics 12:146. doi: 10.1186/1471-2164-12-146.

Poueymiro, M., 2009. Caractérisation fonctionnelle des effecteurs de type III de *Ralstonia solanacearum* : AvrA et PopP1, délimitant le spectre d'hôte et RipTPS, synthétisant une molécule signal chez les plantes. Thèse de Doctorat de l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. 191 pages.

Poueymiro, M., Genin, S., 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. Curr. Opin. Microbiol. 12, 44-52.

Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., Genin, S., 2009. Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22, 538-550.

Poussier, S., Vandewalle, P., Luisetti, J., 1999. Genetic diversity of african and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region genetic. *Appl. Environ. Microb.* 65, 2184-2194.

Poussier, S., 2000. Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes I. 130 pages.

Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., Fegan, M., 2000a. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 479-486.

Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., Trigalet, A., 2000b. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an african subdivision. *Microbiology* 146, 1679-1692.

Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M., Trigalet, A., 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Mol. Microbiol.* 49, 991-1003.

Prior, P., Grimault, V., Schmit J., 1994. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Centre for Agricultural Bioscience International, Wallingford, pp. 209-224.

Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., Prior, P., 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11, 1-16.

Remenant, B., De Cambiaire, J.C., Cellier, G., Jacobs, J.M., Mangenot, S., Lajus, A., Vallenet, D., Medigue, C., Fegan, M., Allen, C., Prior, P., 2011. *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some Asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS One* 6:e24356. doi: 10.1371/journal.pone.0024356.

Remigi, P.H., Anisimova, M., Guidot, A., Genin, S., Peeters, N., 2011. Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts. *New Phytol.* 192, 976-987.

Robertson, A.E., Wechter, W.P., Denny, T.P., Fortnum, B.A., Kluepfel, D.A., 2004. Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 1376-1384.

- Saitou, N., Nei, M., 1987. The Neighbor-Joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4, 406–425.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., Boucher, C.A., 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415, 497-502.
- Sarkar, S.F., Guttman, D.S., 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1999-2012.
- Sarkar, S.F., Gordon, J.S., Martin, G.B., Guttman, D.S., 2006. Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 174, 1041-1056.
- Schell, M., 1996. To be or not to be: how *Pseudomonas solanacearum* decides whether or not to express virulence genes. *Eur. J. Plant Pathol.* 102, 459-469.
- Schell, M.A., 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 263-292.
- Segonzac, C., Zipfel, C., 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 54-61.
- Solé, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K.H., Jones, J.D., Deslandes, L., Valls, M., 2012. The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 941-953.
- Spooner, D.M., Hetterscheid, W.L.A., Van den Berg, R.G., Brandenburg, W.A., 2003. Plant nomenclature and taxonomy: an horticultural and agronomic perspective, in: Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews*. John Wiley & Sons, Inc., New-York, pp. 1-53.
- Staskawicz, B.J., Mudgett, M.B., Dangl, J., Galan, J.E., 2001. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*. 292, 2285-2289.
- Stukenbrock, E.H., McDonald, B.A., 2008. The origins of plant pathogens in agro ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 75-100.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L.I., Fegan, M., 1996. The phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 10-15.
- Tans-Kersten, J., Guan, Y., Allen, C., 1998. *Ralstonia* pectin methylesterase is required for growth on methylated pectin but not for bacterial wilt virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4918-4923.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.

- Valls, M., Genin, S., Boucher, C., 2006. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. PLoS Pathog. 2:e82. doi: 10.1371/journal.ppat.0020082.
- Van den Bosch, F., Gilligan, C.A., 2003. Measures of durability of resistance. Phytopathology 93, 616-625.
- Van Gijsegem, F., Vasse, J., Camus, J.C., Marenda, M., Boucher, C., 2000. *Ralstonia solanacearum* produces hrp-dependent pili that are required for PopA secretion but not for attachment of bacteria to plant cells. Mol. Microbiol. 36, 249-260.
- Vasse, J., Frey, P., Trigalet, A., 1995. Microscopic studies of intercellular infection and protxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 8, 241-251.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C., Brito, B., 2000. The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. Mol. Plant-Microbe Interact. 13, 259-267.
- Wang, J.F., Hanson, P., Barnes, J.A., 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato, in: Prior, P., Allen, C., Elphinstone, J. (Eds.), Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological. Springer Verlag, Berlin, pp. 269-275.
- Ward, H.M., 1902. On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). Ann. Bot. 16, 233-315.
- Wicker, E., 2004. Lutte intégrée contre les maladies telluriques en cultures maraîchères. PRAM, Cirad, Martinique.
- Wicker, E., Coranson-Beaudu, R., Cadasse, S., William, M.A., 2009. Emerging strains of *Ralstonia solanacearum* in the French West Indies raise new challenges to tomato breeders. Acta Hortic. 808, 279-286.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J.C.D., Lemaire, C., Poussier, S., Prior, P., 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. ISME J. 6, 961-974.
- Wroblewski, T., Caldwell, K.S., Piskurewicz, U., 2009. Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas* and *Ralstonia*. Plant Physiol. 150, 1733-49.
- Xu, J., Zheng, H., Liu, L., Pan, Z., Prior, P., Tang, B., Xu, J., Zhang, H., Tian, Q., Zhang, L., Feng, J., 2011. Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82. J. Bacteriol. 193, 4261-4262.
- Yang, B., White, F.F., 2004. Diverse members of the AvrBs3/PthA family of type III effectors are major virulence determinants in bacterial blight disease of rice. Mol. Plant. Microbe Interact. 17, 1192-1200.



## Liste des Annexes

**Annexe 1.** Cycle infectieux de *Ralstonia solanacearum*.

**Annexe 2.** Phylotype, origine géographique, année et hôte d'isolement des 91 souches représentatives de la phylogénie des phylotypes I, II et III de *Ralstonia solanacearum* sélectionnées pour cette étude.

**Annexe 3.** Composition des milieux de mise en culture et des solutions tampons.

**Annexe 4.** Procédure d'extraction d'ADN bactérien par le kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega) sur culture solide.

**Annexe 5.** Couples d'amorces, séquences (5'-3'), températures d'hybridation et tailles attendues des amplicons des huit gènes de ménage sélectionnés pour cette étude.

**Annexe 6.** Récapitulatif des amorces spécifiques des effecteurs utilisés, des protocoles PCR et du polymorphisme observé.

**Annexe 7.** Composition du mélange réactionnel et programmes PCR utilisés pour l'amplification des gènes de ménage et effecteurs.

**Annexe 8.** Echelle de notation des phénotypes chlorotiques et nécrotiques, HR-like (E. Morin 2011, adapté de Wroblewski et al., 2009).

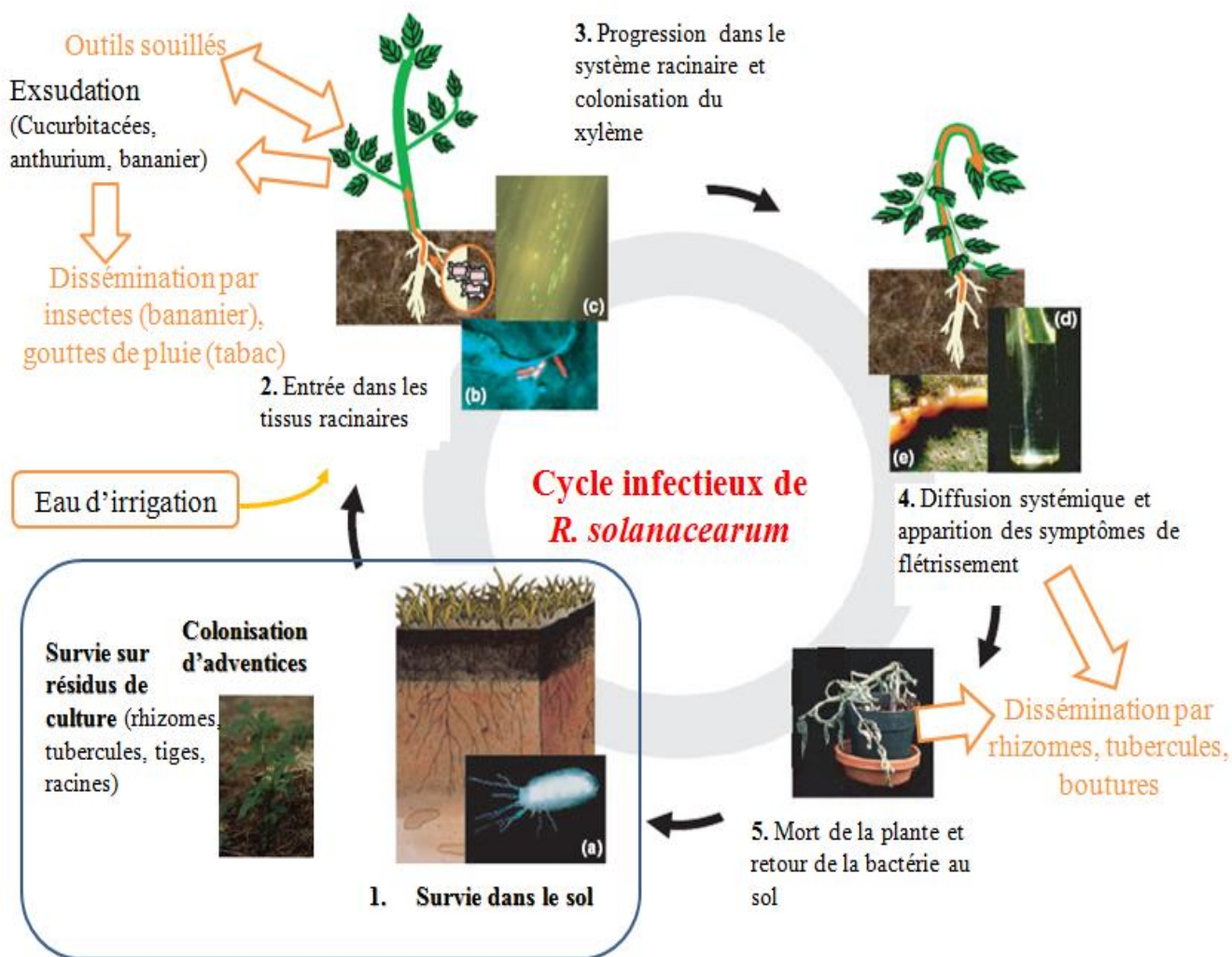
**Annexe 9.** Présence (1)/absence(0) des 10 effecteurs ciblés et le phénotype sur E6 au sein de 78 souches soumises à l'amplification PCR

**Annexe 10.** Lien entre les 11 répertoires d'effecteurs (i.e. groupes 1 à 11) et le phylotype des souches de *Ralstonia solanacearum*. Les souches surlignées en jaune correspondent aux 48 souches non phénotypées sur aubergine.

**Annexe 11.** Phylotype, hôte d'isolement et origine géographique des 20 souches de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I sélectionnées pour le phénotypage sur aubergine E6/E8

**Annexe 12.** Arbres phylogénétiques des effecteurs *RipP1*, *RipP2*, *RipE1* et *RipN* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée





**Annexe 2.** Phylotype, origine géographique, année et hôte d'isolement des 91 souches représentatives de la phylogénie des phylotypes I, II et III de *Ralstonia solanacearum* sélectionnées pour cette étude. Les génomes des souches RUN17, 36, 54 et 133 sont des génomes de référence des phylotypes IIB, IIA, I et III respectivement, et ont déjà été séquencés, publiés et disponibles dans les banques de données. Les génomes des souches RUN39, 157, 215, 969, 1744, 1985, 3012, 3013, 3014 ont été nouvellement séquencés par le laboratoire du CIRAD de la Réunion.

Numéro RUN	Code international	Phylotype	Hôte d'isolement	Origine géographique	Localité	Année	Phénotype sur E6
17	CFBP6783	IIB	<i>Heliconia caribea</i> <sup>a</sup>	Martinique	Morne Rouge	2002	2
36	CFBP2957	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>b</sup>	Martinique	Case Pilote	1987	NA
39	CFBP3059	III	<i>Solanum melongena</i> <sup>c</sup>	Burkina Faso	Vallée du Kou	1990	NA
47	CIP365	I	<i>Solanum tuberosum</i> <sup>d</sup>	Philippines	NA	1989	NA
54	GMI1000	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane	Kourou	1978	0
58	JQ1143	IIA	<i>Solanum tuberosum</i>	La Réunion	Bois Court	NA	1
59	JT510	IIB	<i>Solanum tuberosum</i>	La Réunion	Notre Dame De La Paix	1993	0
85	PSS190	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taïwan	Taipei	1995	NA
104	UW395	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Afrique du Sud	Transvaal	1986	NA
106	UW397	I	<i>Solanum melongena</i>	Afrique du Sud	Transvaal	1986	NA
108	UW399	I	<i>Nicotinia tabacum</i> <sup>e</sup>	Afrique du Sud	Transvaal	1986	NA
133	CMR15	III	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Obala	2005	NA
145	CFBP6942	III	<i>Solanum scabrum</i> <sup>f</sup>	Cameroun	Dschang	2005	0
147	CFBP7029	IIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Baham	2005	4
150	CFBP7032	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Dschang	2005	NA
155	PSS366	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taïwan	Yunlin	2003	NA
156	PSS216	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taïwan	Hsinchu	1996	NA
157	PSS4	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taïwan	Tainan	1988	4
158	ACH92	I	<i>Zingiber officinale</i> <sup>g</sup>	Australie	Queensland	1966	NA
159	PSS358	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taïwan	Yunlin	2003	NA
215	CFBP7058	I	<i>Solanum scabrum</i>	Cameroun	Bafia	2005	NA
353	02-035	I	<i>Capsicum annuum</i> <sup>h</sup>	Martinique	Marigot	2002	NA
356	02-045	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA
523	CFBP4963	IIIC	<i>Solanum tuberosum</i>	La Réunion	NA	NA	0
657	CFBP2146	IIIC	<i>Pelargonium asperum</i> <sup>i</sup>	La Réunion	NA	1980	1
811	02-048	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne des Esses	2002	NA
928	JQ1023	IIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	La Réunion	Mont Vert	1993	3
941	JQ1131	IIB	<i>Solanum tuberosum</i>	La Réunion	Piton Hyacinthe	1992	4
969	TO10	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang	2003	NA
994	RS82	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
996	JCRS23	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
997	JCRS35	I	<i>Solanum melongena</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA

Numéro RUN	Code international	Phylotype	Hôte d'isolement	Origine géographique	Localité	Année	Phénotype sur E6
999	JCRS01	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
1002	RS67	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1008	RS70	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1013	RS53	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Hazaribagh, Bihar	1997	NA
1029	RS22	I	<i>Capsicum sp.</i>	Inde	Bhubaneshwar, Orissa	1996	NA
1032	JCRS26	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
1039	RS15	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	1995	NA
1040	RS32	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Bangalore, Karnataka	1997	NA
1042	RS14	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	1995	NA
1047	RS51	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Hazaribagh, Bihar	1997	NA
1050	RS48	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA
1109	RS43	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA
1114	RS66	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
1143	02-047	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA
1216	RS79	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
1234	RS35	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Bangalore, Karnataka	1997	NA
1240	RS44	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA
1251	RS69	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1533	CIV3	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon	2010	1
1538	CIV8	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon	2010	1
1539	CIV9	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon	2010	2
1546	CIV16	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Anguédédou	2010	3,1
1739	CIV18	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Bonoufla	2010	2
1740	CIV19	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Daloa	2010	2
1743	CIV22	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Daloa	2010	2
1744	CIV23	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Man	2010	2
1747	CIV26	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2010	4
1753	CIV32	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2010	5
1756	CIV35	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2010	3,2
1761	CIV40	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta	2010	4
1762	CIV41	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta	2010	1
1771	CIV49	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Souandala	2010	2
1792	CIV55	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Djebonoua-Kondoukro	2010	5
1793	CIV56	III	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Djebonoua-Kondoukro	2010	2

Numéro RUN	Code international	Phylotype	Hôte d'isolement	Origine géographique	Localité	Année	Phénotype sur E6
1802	CIV65	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Agnibilekro-Attobro	2010	1
1854	CIV98	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Yamousoukro Nanan	2011	2
1861	CIV105	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta Houphouékro (Divo)	2011	1
1867	CIV111	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta Houphouékro (Divo)	2011	1
1884	CIV128	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Pakobo (Tiassalé)	2011	1
1898	CIV142	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2011	1
1900	CIV144	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2011	5
1916	CIV160	I	<i>Capsicum annuum</i>	Côte d'Ivoire	Bassam	2011	1
1924	CIV168	I	<i>Croton hirsutus</i> <sup>j</sup>	Côte d'Ivoire	Bassam	2011	2
1947	CIR011-076	IIB	<i>Capsicum annuum</i>	Guyane	Cacao	2011	3,2
1966	CIR011-152	IIB	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Wayabo	2011	2
1976	CIR011-187	IIB	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Corossoni	2011	2
1984	CIR011-206	I	<i>Capsicum annuum</i>	Guyane	Javouhey	2011	NA
1985	CIR011-208	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Javouhey	2011	5
1986	CIR011-209	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Javouhey	2011	NA
1987	CIR011-219	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Javouhey	2011	NA
1992	CIR011-239	IIB	<i>Cucurbita pepo</i> <sup>k</sup>	Guyane	Cacao	2011	2
1994	CIR011-242	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane	Montsinéry	2011	2
2004	CIR011-253	IIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane	Corossoni	2011	2
2174	012-011	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Saint Laurent du Maroni	2012	NA
2175	012-012	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Saint Laurent du Maroni	2012	NA
2176	012-013	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane	Saint Laurent du Maroni	2012	NA
3012	TD1301	I	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon	NA	2013	NA
3013	RD1301	I	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon	NA	2013	NA
3014	TF3108	I	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon	NA	2013	NA

NA : données manquantes

<sup>a</sup>:balisier, <sup>b</sup>: tomate, <sup>c</sup>: aubergine, <sup>d</sup>:pomme de terre, <sup>e</sup>:tabac, <sup>f</sup>:morelle, <sup>g</sup>: gingembre, <sup>h</sup>: poivron/piment, <sup>i</sup>: géranium, <sup>j</sup>: croton, <sup>k</sup>: courge/courgette

**Annexe 3.** Composition des milieux de mise en culture et des solutions tampons.

**Annexe 3a.** Composition du bouillon nutritif (pour 1 litre de bouillon).

Ingrédient	Dose
« 64065 » (BIO RAD) Nutrient broth	13 g
Eau osmosée	1L

**Annexe 3b.** Composition du milieu Kelman (pour 1 litre).

Ingrédient	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycérine	6,3 g
NaOH, N	1,7 g
Eau osmosée	1L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphényltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL

**Annexe 3c.** Composition du milieu Sequeira modifié (pour 1 litre).

Ingrédient	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycérine	6,3 g
NaOH, N	1,7 g
Eau osmosée	1 L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphenyltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL
Cristal violet	3 mg
Polymyxine B Sulfate	10 mg
Tyrothricine	20 mg
Chloramphénicol	5 mg
Pénicilline	20 unités

**Annexe 3d.** Composition du milieu Kelman + Spectinomycine (pour 1 litre).

Ingrédient	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycérine	6,3 g
NaOH, N	1,7 g
Eau osmosée	1L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	

Chlorure de Triphényltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL
Spectinomycine	40 mg

**Annexe 3e.** Composition du milieu Kelman + Gentamycine (pour 1 litre).

Ingrédient	Dose
Pastone	11 g
Agar	18 g
Glycérine	6,3 g
NaOH, N	1,7 g
Eau osmosée	1L
<i>Autoclavage (120°C, 20')</i>	
Chlorure de Triphényltetrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	80 µL
Gentamycine	10 mg

**Annexe 4.** Procédure d'extraction d'ADN bactérien par le kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega) sur culture solide.

Ce protocole est dérivé de la notice Promega : « Isolation of Genomic DNA from Gram Positive and Gram Negative Bacteria ».

- Faire une culture sur Kelman (1/4 de boîte), 24h à 28°C
- Collecter la culture avec une anse 10µL, sans prendre trop de culture
- Transférer en 1 mL de NaCl 0,5M
- Vortexer fortement
- Centrifuger 12000 g / 3 min à 4°C
- Elimination du surnageant. **A ce stade, les culots peuvent être conservés à -20°C pendant 2 semaines.**

1. Resuspendre le culot dans 600µL de Nuclei Lysis Solution, vortexer fortement.
2. Incuber à 80°C (Thermomixer ou bain-marie) pendant 5-10 min ou jusqu'à obtention d'un lysat clair ; vortexer vigoureusement durant l'incubation si nécessaire.
3. Refroidir à température ambiante puis ajouter 3µL de Rnase A.
4. Incuber 1h à 37°C (Thermomixer en agitation, ou bain-marie).
5. A ce stade, il est important que la solution ne renferme aucune particule ou bulle ou matière solide.
6. Ajouter 200µL de Protein Precipitation Solution, vortexer vigoureusement pendant 20 s.
7. Incuber 5 min dans la glace.
8. Centrifuger 12 min à 20000 g, 4°C.
9. Transférer délicatement le surnageant (~ 800µL) dans un nouveau tube contenant 600 µL d'isopropanol (=propan-2-ol, ou propanol-2), en évitant la moindre particule. Si des particules sont présentes, il est préférable de transférer moins de surnageant.
10. Mélanger par inversion, **NE PAS VORTEXER**. L'ADN précipite au fond du tube.
11. Centrifuger 4 min à 20000 G, T° ambiante.
12. Retirer le surnageant avec précaution, jeter.
13. Laver délicatement le culot d'ADN avec 600µL d'Ethanol 70% (par inversion de tube). Si le culot se détache, recentrifuger selon les conditions 11.

14. Retirer autant d'éthanol que possible sans détacher le culot.
15. Sécher le culot 30 min au SpeedVac à T° ambiante (Drying=Low).
16. Resuspendre l'ADN dans 200µL de DNA Rehydration Solution. **NE PAS VORTEXER**. Pour activer la solubilisation, incuber 1H à 65°C, ou la nuit à T° ambiante.
17. Une fois que l'ADN est bien dissous, stocker à -20°C.

**Annexe 5.** Couples d'amorces, séquences (5'-3'), températures d'hybridation et tailles attendues des amplicons des huit gènes de ménage sélectionnés pour cette étude.

Gène	Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm (°C)	Taille attendue (pb)	Température d'hybridation (°C)	Nombres de cycles
gdhA	gdhA-Rs_204F	CCGCATCGCCCACTTCGAG	58,06	1049	54	30
	gdhA-Rs_1252R	TGCAGAATCCGCGTACAGGC	57,44			
mutS	mutS-Rs_1875F	ACAGCGCCTTGAGCCGGTACA		758	66	30
	mutS-Rs_2644R	GCTGATCACCGGCCGAACAT				
leuS	leuS_29F	TCGAACAGCAGGCGCAGCAACACG	62,78	978	59	30
	leuS_1006R	CGACCCACACGGGCACGGC	63,08			
gyrB	gyrB-Rs_113F	GGCACC GGCTGCACCACC	63,08	1152	63	25
	gyrB-Rs_1264R	GCCCTTGCGGCGGTCATCTC	63,25			
adk	Adk_12F	TCTGTTGGGCGCACCCGGC		420	62	30
	Adk_556R	CCCAGCCGGAGTAGTAGTCC				
rplB	rplB-RS_01F	ATGGCACTCGTCAAGACCAA	53,75	814	50	30
	rplB-RS_814R	TTAACGCTTGTGACGGCG	53,26			
Egl	Endo_16F	ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC		750	70	30
	Endo_832R	GCGTTGCCCGGCACGAACACC				
fliC	Rsol-fliC_198F	GAACGCCAACGGTGCGAACT		400	63	30
	Rsol-fliC_597R	GGCGGCCTTCAGGGAGGTC				

**Annexe 6.** Récapitulatif des amorces spécifiques des effecteurs utilisés, des protocoles PCR et du polymorphisme observé.

**Annexe 6a.** Couples d'amorces externes, séquences (5'-3'), températures de fusion (Tm), et d'hybridation, tailles attendues des amplicons et détection de polymorphisme des 10 effecteurs sélectionnés pour cette étude

Effecteur	Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm (°C)	Taille attendue (pb)	Détection de polymorphisme	Température d'hybridation (°C)	Nombres de cycles
RipP1	ripP1E-260F	AAAAATCGGCACTCGTCAACC	59,7	947	+	55	30
	ripP1E-1214R	TGAACACCGTTGTGACGCGAT	60,3				
	rip1-GE_943F	TCATTATCTTGAGCCGGCC	59,9	807	-	57	30
	rip1-GE_1749R	GTCATCTCTGACGTAGCCGG	60,0				
RipP2	popP2GE_169F			1189		55	30
	popP2Ge_1357R						
	popP2GE_126F		60,06	1964	+	63	30
	popP2GE_2090R		6,01				
	ripP2E-O_404F	CAAACGTAGCCACACCTAC	60,0	949		57	30
	ripP2E-O_1358R	TCCTCGCCGAATTCGTATT	60,1				

Effecteur	Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm (°C)	Taille attendue (pb)	Détection de polymorphisme	Température d'hybridation (°C)	Nombres de cycles
RipP2	ripP2-E-O_1054F	GTCACTGAAAACGTTCGCAA	59,9	891	+	63	30
	ripP2-E_O_1953R	TGCGTCTCCATCCAAATCGA	60,0				
RipG3	ripG3E1-3_180F	GCTATCTCGTGATTGCCGC	59.1	997	-	56	30
	ripG3E1-3_1177R	CTCGTCGCCGATCTGGTTC	60.6				
	ripG3E1-3_1425F	TCACGACGCTGTTGATCGAA	60.0	791	-	57	30
	ripG3E1_2227R	TCAAATCCGCAGCGTCACG	61.4				
Rip N	ripN-E_363F	GAATCCACGCCCTTCTTCGC	59.9	811	-	56	30
	ripN-E_1173R	GGTGTGGCCGATGTAGTTCA	60.0				
	ripN-E_905F	CGATGCAGCATTCGTC AAC	60.2	1027	-	56	30
	ripN-E_1931R	GGACTTCTCGCGGAGAT	59.5				
RipAX2	ripAX2-ph1_309F	TGTACTCGCCCCATCAGTTG	59.8	858	-	57	30
	ripAX2-ph1_1167R	TTCAGGCGAGCCATTGACAA	60.3				
RipE1	ripE1E_282F	GTTTCGAGGTCAGGCCGAC	61.4	822	-	57	30
	ripE1E_1155R	CCAGAAGTGGTCGAAGTCGT	60.4				
	ripE1E_975F	CATCCAGGAATCCATGTGGC	59.6	992	-	57	30
	ripE1E_1970R	AGCGGCATGTTTCATCGTCAA	61.1				
RipAU	ripAU-E-ph1y3_327F	GGCGACACCGGTTCTGTTT	61.8	1106	+	57	30
	ripAU-E-ph1y3_1433R	CCCGCATCTCCCGTTTGATA	60.7				
	ripAU-E-ph2-302F	CGACACCTGTTCTGTTGCC	60.4	964	-	57	30
	ripAU-E-ph2_1265R	TCCACCGTCCGTTGTTGATC	61.0				
RipAJ	ripAJ-ph1_25F	TGATCTTCTGGCGCTGG	60.6	1178	-	56	30
	ripAJ-ph1_1226R	GAAAACACGGCAGTCTGGAG	59.8				
	ripAJ-ph1_701F	CAGACTGATGAACGTGGCGA	61.0	732	-	57	30
	ripAJ-ph1_1432R	ATGGATGCGCAGGTCTGATT	60.4				
RipAZ1	ripAZ1E_69F	GGAACGGGAGGGGAAAGAC	61.1	775	-	57	30
	ripAZ1E_858R	GCCAAAATCCGGCGCTTG	61.3				
	ripAZ1E_70F	GAACGGGAGGGGAAAGACAT	60.4	1527	-	56	30
	ripAZ1E_1635R	GACATGCTCAACCACCTGC	60.0				
	ripAZ1E_840F	GCAAGCGCCGGATTTTGG	61.3	519	-	56	30
	ripAZ1_1376R	ATCCGCTGTCATCGCGAG	60.8				
RipAS	ripAS-Eph1y3_391F	CCGAGTGAGCCGGTCCAT	62.9	755	-	58	30
	ripAS-Eph1y3_1370R	GGCGGCAGGCTGTAGAAG	61.8				
	ripAS-Eph1y3_1146F	CAGGGTCACGCTGTTCCA	60.7	987	+	57	30
	ripAS-Eph1y3_2132R	ATCAGCCGTGGAGAGATGTC	60.1				
	ripAS-Eph1y3_2050F	CTGGAGCGGGCCATTTCAG	61.9	943	-	57	30
	ripAS-Eph1y3_2992R	CGTACCGGTTCCAGGCATC	61.6				
	ripAS-Eph1y3_2624F	TGAACCTGGCCGATGAGG	60.2	800	-	57	30
	ripAS-Eph1y3_3423R	CCGTCGCCGTTCAACTTCTA	61.0				



**Annexe 6b.** Couples d'amorces internes, séquences (5'-3'), températures de fusion (Tm), et d'hybridation, tailles attendues des amplicons et détection de polymorphisme des effecteurs sélectionnés pour cette étude (Pensec, 2010; N'Guessan, 2012).

Effecteur	Nom des amorces	Séquence 5'-3'	Tm (°C)	Taille attendue (pb)	Détection de polymorphisme	Température d'hybridation (°C)	Nombres de cycles
RipP1	RSc0826_19F	GCATTGGGCGTCAGTCAACCG	59,59	1088	-	55	30
	RSc0826_1106R	CACGACTCCAGGGCATGTCGAA	59,5				
RipG3	ripG3I1-3_537F	GACCCTCGTCGGCAATTTCT	60,4	912	-	57	30
	ripG3I1_1448R	AGCGTCTTGATCGTCTTGCT	59,8				
RipN	RSp1130_123F	CTCGGACGTGACCAGCAACCT	59,72	1231	-	56	30
	RSp1130_1353R	CGTCTCCCCGGCCTTCAACT	59,93				
RipAX2	RSp0572_60F	CGAAGCTGACCGTTATGCGGG	58,86	468	+	55	30
	RSp0572_527R	CCTGCCTCGCTGGTTTCGTTG	59,31				
RipE1	ripE1I_665F	GGTCGACAACGTCCATATCG	59,1	613	-	56	30
	ripE1I_1287R	CAGATCGGATGCGACTTCGA	60,6				
RipAU	RSp1460_6F	GCTCACACGCACTCCACCC	59,40	812	-	56	30
	RSp1460_817R	GCGGCGCTTTCCGATGCT	59,59				
RipAJ	ripAJ_ph1_488F	ATGCAGATACGCAACGTCC	58,8	814	+	55	30
	ripAJ_ph1_1319R	GAACGTTTCGGCAGGAAAA	59,2				
RipAZ1	RSp1582_23F	ACAAGGACTATGGGGAAGACGACGC	60,64	541	-	56	30
	RSp1582_563R	TCGCGCAAGGCATCGAGCAAG	61,16				

**Annexe 7.** Composition du mélange réactionnel et programmes PCR utilisés pour l'amplification des gènes de ménage et effecteurs.

**Annexe 7a.** Composition du mélange réactionnel (pour 1 réaction) pour amplification des gènes de ménage et effecteurs.

Composition	Volume (µL)
Eau ultra pure	22,8
Tampon GOTAQ Colorless 5X	10,0
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0
dNTP (10mM)	1,0
Amorce F	0,5
Amorce R	0,5
Q solution 5X	10,0
GOTaq (5U/µL)	0,2
TOTAL	48

**Annexe 7b.** Programmes PCR modifiés pour les couples amorces pour l'amplification (i) des gènes de ménage et (ii) effecteurs sélectionnés. Les programmes PCR encadrés en rouge correspondent au programme pour lequel le maximum d'amplifications (sans bandes aspécifiques) a été obtenu parmi les souches soumises à l'amplification PCR.

**RipP1 (RSc0826) – Amorces externes 260F/1214R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
55°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
56°	90 sec	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	25 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipP1 (RSc0826) – Amorces internes 19F/1106R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
55°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
59°	90 sec	
72°		
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	35 cycles
94°	30 sec	
57°	90 sec	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipP2 (RSc0868) – Amorces externes P2-G-E126F/2090R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
63°	1 min	
72°	2 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	25 cycles
94°	30 sec	
64°	1 min	
72°	2 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
64°	1 min	
72°	2 min	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipAJ = RSc2101 Primers 5' ripAJ-ph1-25F/1226R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipAJ = RSc2101 Primers 3' ripAJ-ph1-701F/1432R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
58°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipAX2 = RSp0572 Primers ripAX2-ph1-309F/1167R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
59°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
62°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

### RipN = RSp1130 Primers 5' ripN-E-363F/1173R

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
59°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

**RipN = RSp1130 Primers 3' ripN-E-905F/1931R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
59°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

**RipP2 = RSc0868 Primers popP2GCI169F/1357R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
55°	1 min	
72°	2 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
52°	90 sec	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
52°	90 sec	
72°	2 min	
72°	10 min	
12°	pause	

**RipG3 = RSp0023 Primers ripG3I1\_537F/1448R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
59°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

**RipE1 = RSc3369 Primers 3' ripE1E-282F/1155R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	25 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

**RipE1 = RSc3369 Primers 3' ripE1E-282F/1155R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 2		
96°	5 min	25 cycles
94°	30 sec	
56°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	







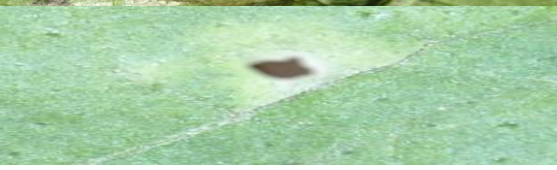



**RipP1 = RSc0826 Primers ripP1I-19F/1103R**

Programme 1		
96°	5 min	30 cycles
94°	30 sec	
55°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 3		
96°	5 min	35 cycles
94°	30 sec	
57°	90 sec	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 4		
96°	5 min	35 cycles
94°	30 sec	
55°	90 sec	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

**Annexe 8.** Echelle de notation des phénotypes chlorotiques et nécrotiques, HR-like (E. Morin 2011, adapté de Wroblewski et al., 2009).

	0	Aucun symptôme
	1	Chlorose
	2	Chlorose sévère
	3	Chlorose + ou – sévère accompagnée de brunissement localisé au niveau des nervures
	4	Chlorose + ou – sévère accompagnée de brunissement localisé au niveau des nervures sur la face supérieure et de brunissement total sur la face inférieure
	5	Chlorose + ou – sévère accompagnée de brunissement généralisé (une ou deux faces)
	6	Chlorose accompagnée d'un ou deux spots nécrotiques
	7	Chlorose + effondrement des tissus + présence éventuelle de brunissement ou de nécrose
	8	Nécrose
	9	Nécrose sévère

**Annexe 9.** Présence (1)/absence(0) des 10 effecteurs ciblés et le phénotype sur E6 au sein de 78 souches soumises à l'amplification PCR. Les cases rouges, vertes foncées et vertes pâles correspondent respectivement à : absence de l'effecteur (0); présence du gène amplifié avec les amorces externes (1); et présence du gène amplifié avec les amorces internes (1). 1\* signifie que le gène a été amplifié partiellement avec les amorces externes (soit en 5', soit en 3') et qu'aucune amplification PCR n'a été réalisée avec les amorces internes.

Origine géographique	Número RUN	Phylotype	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipAX2	RipN	RipAU	RipAZ1	RipAS	Phénotype sur E6
Philippines	47	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	NA
La Réunion	58	IIA	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	1
La Réunion	59	IIB	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1*	0
Taïwan	85	I	1	0	1	1	1	1	1	0	1*	0	NA
Afrique du Sud	104	I	0	0	0	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Afrique du Sud	106	I	1	1	0	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Afrique du Sud	108	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Cameroon	145	III	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1*	0
Cameroon	147	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	4
Cameroon	150	IIA	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1*	NA
Taïwan	155	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	NA
Taïwan	156	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	NA
Australie	158	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Taïwan	159	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1*	NA
Martinique	353	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Martinique	356	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1*	NA
La Réunion	523	III	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	0
La Réunion	657	III	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	1
Martinique	811	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
La Réunion	928	IIB	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1*	3
La Réunion	941	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1*	4
Indonésie	994	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Thaïlande	996	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	1*	NA
Thaïlande	997	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Thaïlande	999	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	1	NA
Inde	1002	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Inde	1008	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Inde	1013	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1029	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	1032	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Thaïlande	1039	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Inde	1040	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	NA
Thaïlande	1042	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Inde	1047	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1050	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1109	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1114	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Martinique	1143	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Indonésie	1216	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Inde	1234	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Indonésie	1240	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Inde	1251	I	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1*	NA
Côte d'Ivoire	1533	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1538	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1539	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	2
Côte d'Ivoire	1546	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	3,1
Côte d'Ivoire	1739	I	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	2
Côte d'Ivoire	1740	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1743	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1747	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	4
Côte d'Ivoire	1753	IIA	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	5
Côte d'Ivoire	1756	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3,2
Côte d'Ivoire	1761	IIA	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	4
Côte d'Ivoire	1762	IIA	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Côte d'Ivoire	1771	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2
Côte d'Ivoire	1792	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
Côte d'Ivoire	1793	III	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1*	2
Côte d'Ivoire	1802	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	1
Côte d'Ivoire	1854	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Côte d'Ivoire	1861	IIA	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Côte d'Ivoire	1867	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	1
Côte d'Ivoire	1884	IIA	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Côte d'Ivoire	1898	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	1
Côte d'Ivoire	1900	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	5
Côte d'Ivoire	1916	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Côte d'Ivoire	1924	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2
Guyane	1947	IIB	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	3,2
Guyane	1966	IIB	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	2
Guyane	1976	IIB	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1*	2
Guyane	1984	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1*	1	NA
Guyane	1986	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Guyane	1987	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	NA
Guyane	1992	IIB	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	2
Guyane	1994	IIA	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1*	2
Guyane	2004	IIB	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	2
Guyane	2174	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	NA
Guyane	2175	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA
Guyane	2176	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA

**Annexe 10.** Lien entre les 11 répertoires d'effecteurs (i.e. groupes 1 à 11) et le phylotype des souches de *Ralstonia solanacearum*. Les souches surlignées en jaune correspondent aux 48 souches non phénotypées sur aubergine.

Numéro RUN	Phylotype	Origine géographique	Groupe génotypique
47	I	Philippines	1
158	I	Australie	
523	III	La Réunion	
657	III	La Réunion	
106	I	Afrique du Sud	2
156	I	Taiwan	
215	I	Cameroun	
353	I	Martinique	
356	I	Martinique	
811	I	Martinique	
1143	I	Martinique	
1029	I	Inde	
996	I	Thaïlande	
997	I	Thaïlande	
999	I	Thaïlande	
1039	I	Thaïlande	
1042	I	Thaïlande	
1050	I	Indonésie	
1240	I	Indonésie	
994	I	Indonésie	
969	I	Indonésie	
1546	I	Côte d'Ivoire	
1740	I	Côte d'Ivoire	
1743	I	Côte d'Ivoire	
1771	I	Côte d'Ivoire	
1792	I	Côte d'Ivoire	
1793	III	Côte d'Ivoire	
1867	I	Côte d'Ivoire	
1898	I	Côte d'Ivoire	
1900	I	Côte d'Ivoire	
1916	I	Côte d'Ivoire	
1924	I	Côte d'Ivoire	
1986	I	Guyane	
1987	I	Guyane	
2174	I	Guyane	
2175	I	Guyane	
2176	I	Guyane	
54	I	Guyane	
1994	IIA	Guyane	3
85	I	Taiwan	4
155	I	Taiwan	
159	I	Taiwan	
145	III	Cameroun	
108	I	Afrique du Sud	
39	III	Burkina Faso	
1109	I	Indonésie	
3014		La Réunion	
3012		La Réunion	
3013		La Réunion	
1744	I	Côte d'Ivoire	
1539	I	Côte d'Ivoire	
1802	I	Côte d'Ivoire	
1984	I	Guyane	5
1985	I	Guyane	
157	I	Taiwan	
36	IIA	Martinique	
17	IIB	Martinique	
133	III	Cameroun	6
58	IIA	La Réunion	
59	IIB	La Réunion	
1002	I	Inde	
1008	I	Inde	
1040	I	Inde	
1251	I	Inde	
1739	I	Côte d'Ivoire	
1747	I	Côte d'Ivoire	7
104	I	Afrique du Sud	
150	IIA	Cameroun	

Numéro RUN	Phylotype	Origine géographique	
1013	I	Inde	
1047	I	Inde	
1114	I	Indonésie	
1234	I	Inde	
1032	I	Thaïlande	8
1216	I	Indonésie	
1533	I	Côte d'Ivoire	
1538	I	Côte d'Ivoire	
1756	I	Côte d'Ivoire	
1854	I	Côte d'Ivoire	
1976	IIB	Guyane	
147	IIB	Cameroun	9
928	IIB	La Réunion	
941	IIB	La Réunion	
1753	IIA	Côte d'Ivoire	10
1761	IIA	Côte d'Ivoire	
1762	IIA	Côte d'Ivoire	
1861	IIA	Côte d'Ivoire	
1884	IIA	Côte d'Ivoire	
2004	IIB	Guyane	
1947	IIB	Guyane	11
1966	IIB	Guyane	
1992	IIB	Guyane	

**Annexe 11.** Phylotype, hôte d'isolement et origine géographique des 20 souches de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I sélectionnées pour le phénotypage sur aubergine E6/E8

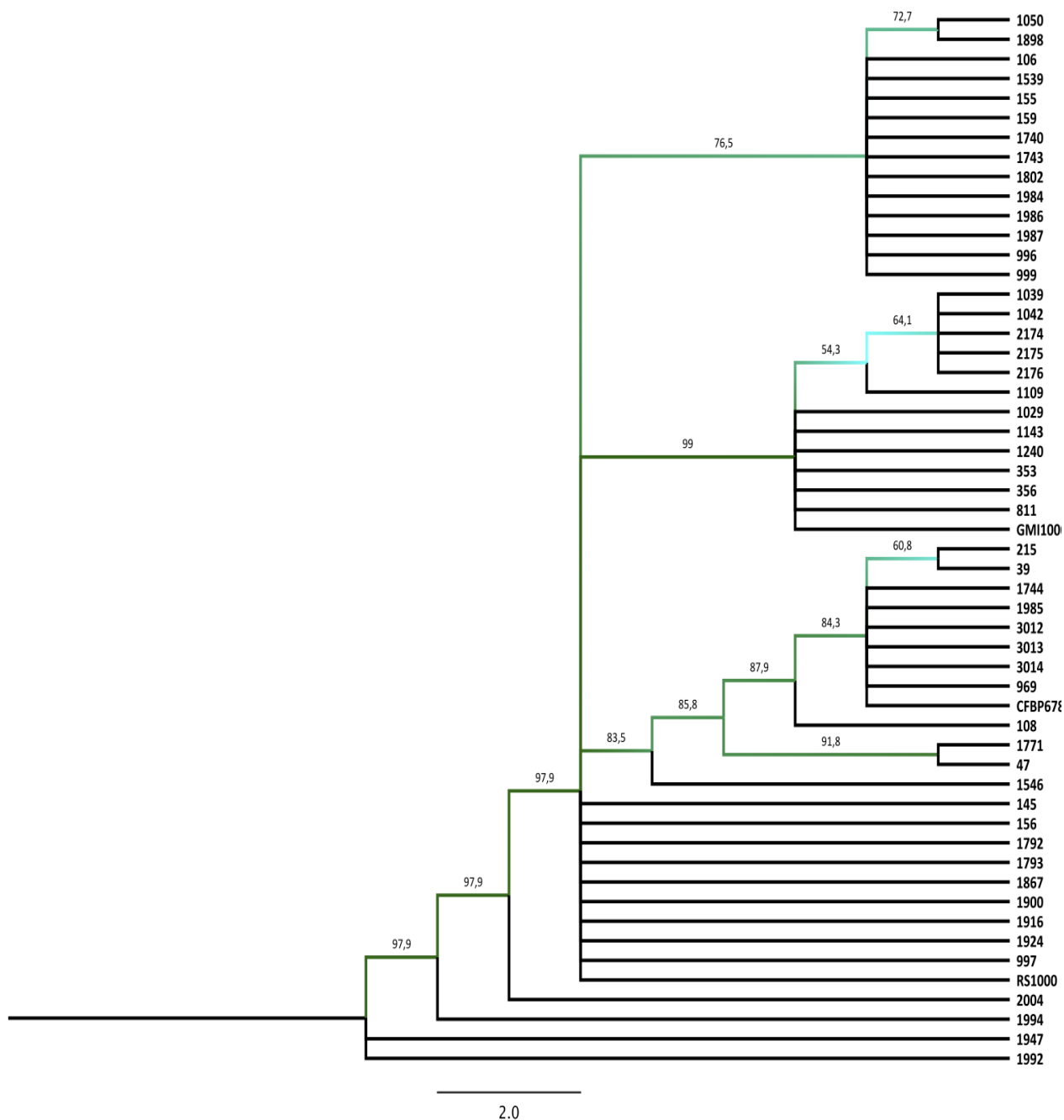
Numéro RUN	Code international	Répertoires d'effecteurs	Hôte d'isolement	Origine géographique
47	CIP365	1	<i>Solanum tuberosum</i> <sup>a</sup>	Philippines
158	ACH92	1	<i>Zingiber officinale</i> <sup>e</sup>	Australie
106	UW397	2	<i>Solanum melongena</i> <sup>c</sup>	Afrique du Sud
1050	RS48	2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie
969	TO10	2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie
997	JCRS35	2	<i>Solanum melongena</i>	Thaïlande
1029	RS22	2	<i>Capsicum sp.</i> <sup>f</sup>	Inde
1240	RS44	2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie
1987	CIR011-219	2	<i>Solanum melongena</i>	Guyane
2174	012-011	2	<i>Solanum melongena</i>	Guyane
2175	012-012	2	<i>Solanum melongena</i>	Guyane
2176	012-013	2	<i>Solanum melongena</i>	Guyane
3012	TD1301	4	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon
3013	RD1301	4	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon
3014	TF3108	4	<i>Solanum melongena</i>	La Réunion-Vallon
108	UW399	4	<i>Nicotinia tabacum</i> <sup>d</sup>	Afrique du Sud
1002	RS67	6	<i>Solanum melongena</i>	Inde
104	UW395	7	<i>Solanum lycopersicum</i> <sup>b</sup>	Afrique du Sud
1114	RS66	7	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie
1032	JCRS26	8	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande

<sup>a</sup> : pomme de terre; <sup>b</sup> : tomate; <sup>c</sup> : aubergine; <sup>d</sup> : tabac; <sup>e</sup> : gingembre; <sup>f</sup> : poivron/piment



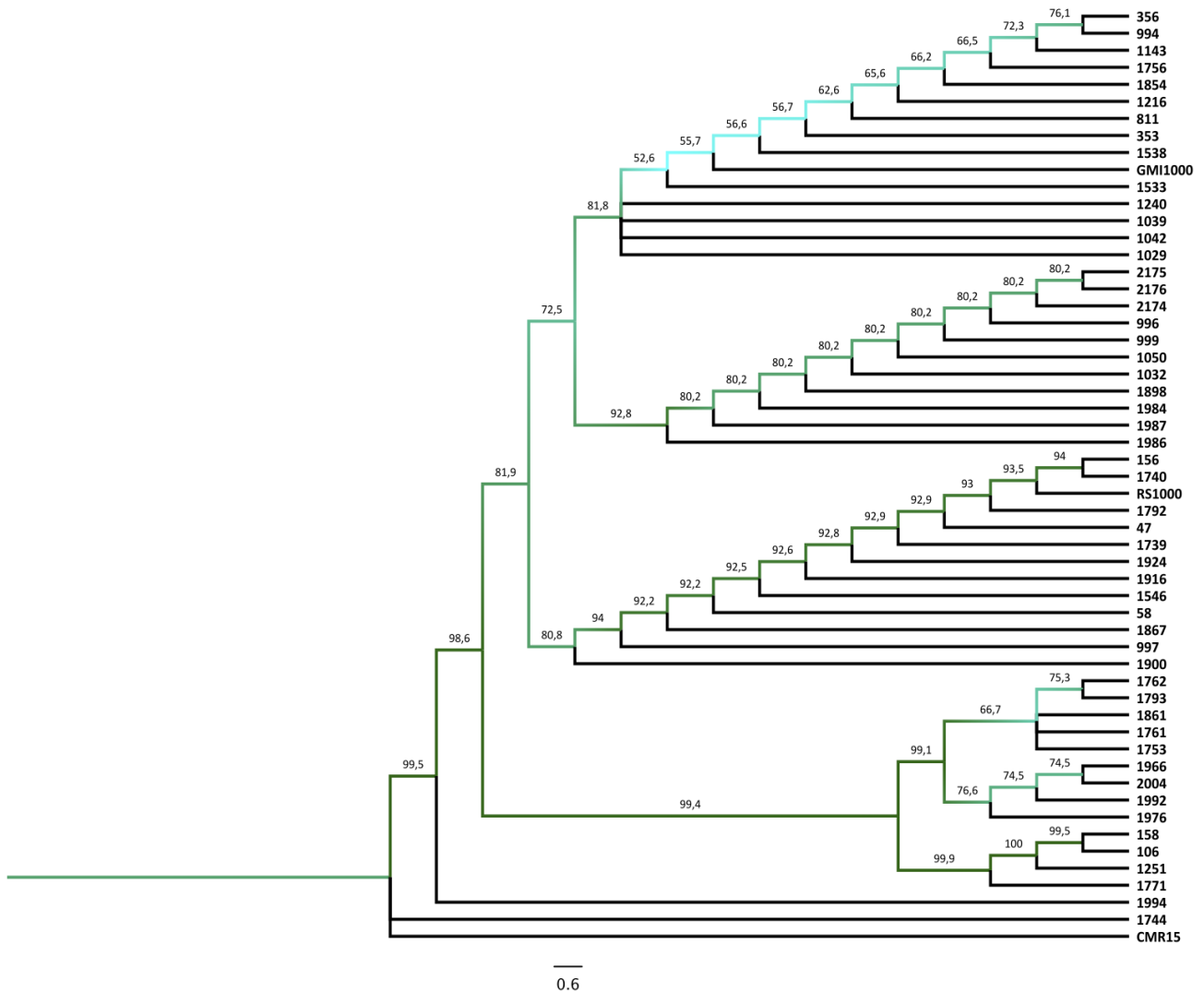
**Annexe 12.** Arbres phylogénétiques des effecteurs *RipP1*, *RipP2*, *RipE1* et *RipN* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée.

**Annexe 12a.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *RipP1* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, et CFBP6783 au phylotype IIB.

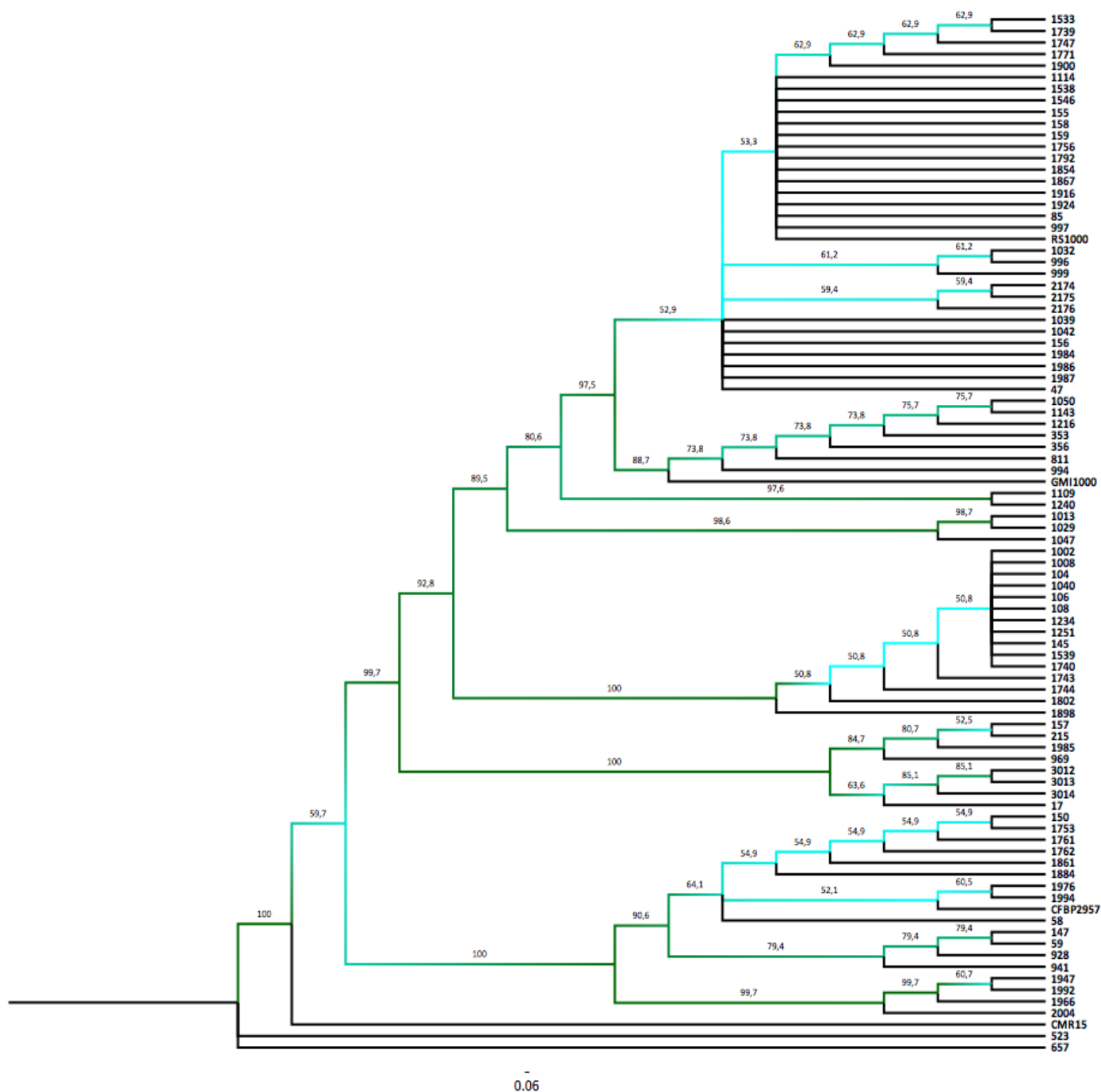




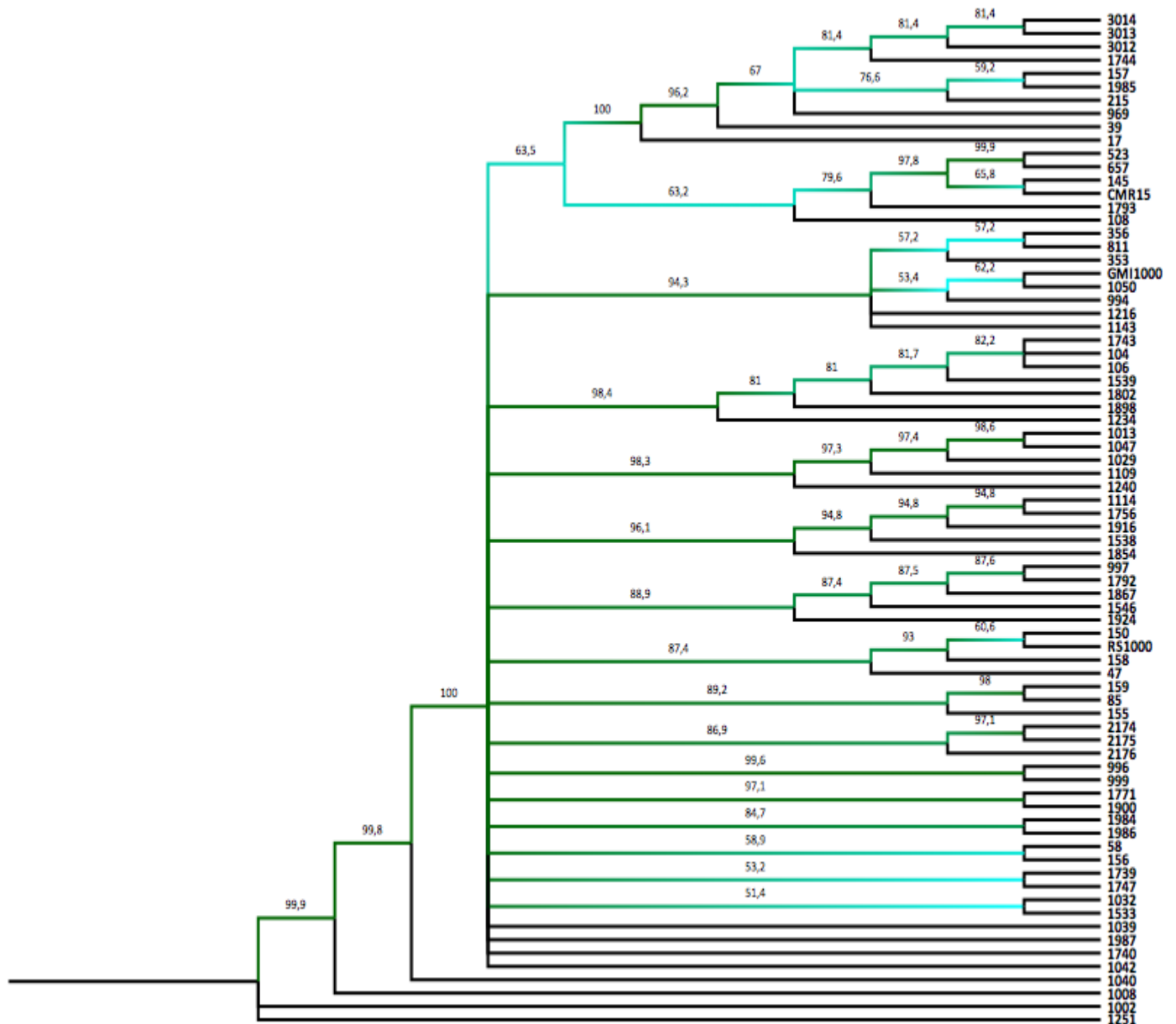
**Annexe 12b.** Arbre phylogénétiques construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *RipP2*, des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, et CMR15 au phylotype III.



**Annexe 12c.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *RipE1* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, CFBP2957 au phylotype IIA, et CMR15 au phylotype III.

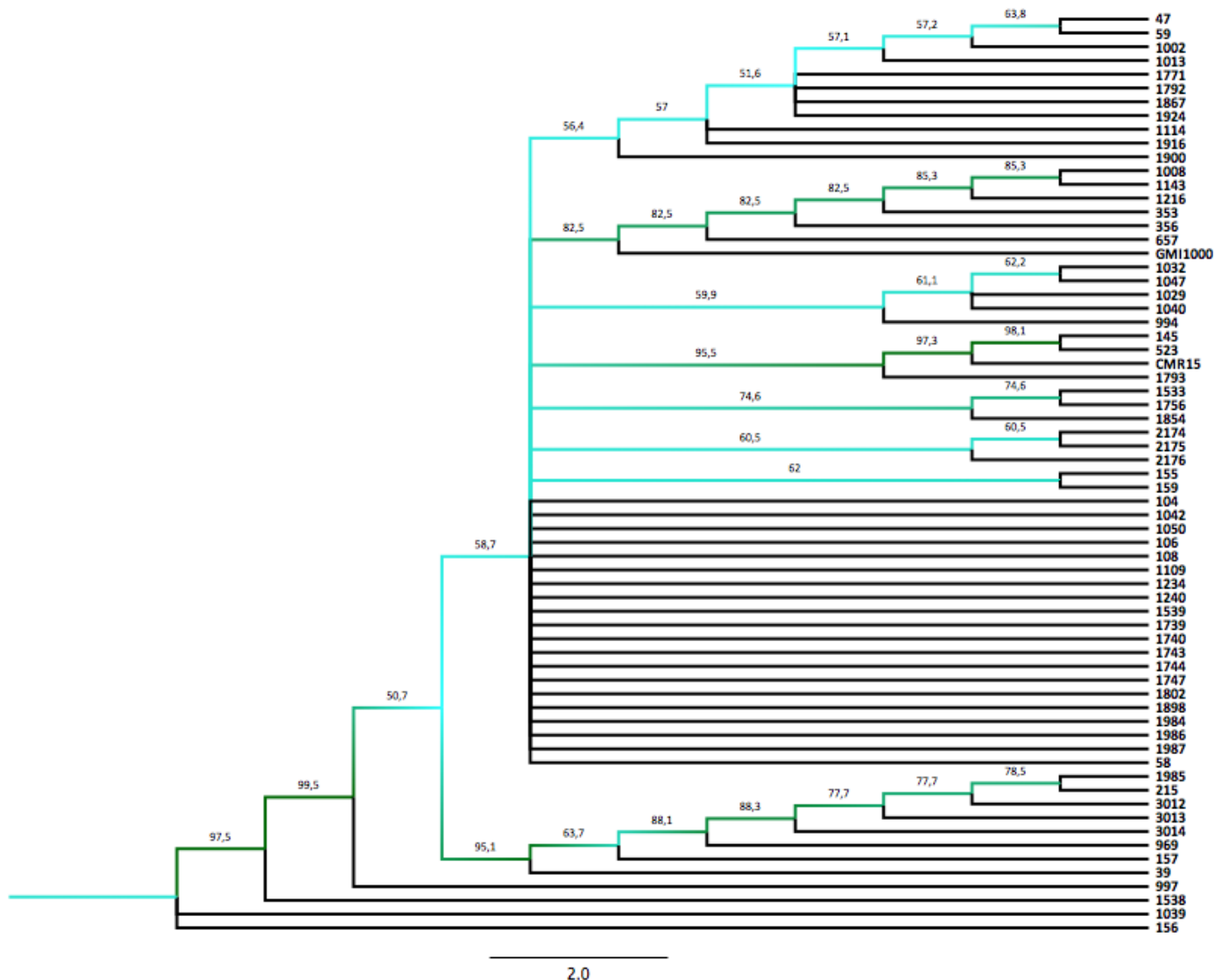


**Annexe 12d.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *RipN* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I.



0.2

**Annexe 12e.** Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *RipAU* des souches de *Ralstonia solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice bootstrap (paramétrés à 1000). GMI1000 est une souche de référence appartenant au phylotype I, et CMR15 au phylotype III.



**Résumé :** *Ralstonia solanacearum* est une Béta-protéobactérie à la taxonomie complexe capable d'infecter 250 espèces hôtes et responsable du flétrissement bactérien. Pour évaluer la durabilité de résistance aux Solanacées, il semble important de comprendre le rôle des effecteurs de type 3 (ET3), déterminants majeurs de la virulence de la bactérie dans le contournement ou l'activation de la résistance des plantes. Cette étude consiste à mettre en évidence les effecteurs impliqués dans la spécificité de virulence sur aubergine. Dix ET3 putativement associés à la virulence ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction) et séquencés dans une collection de 91 souches bactériennes. Huit gènes de ménages ont aussi été amplifiés et séquencés afin de reconstruire la phylogénie des souches étudiées. Les phylogénies construites à partir de ces huit gènes ont été comparées à celle établies sur les effecteurs. Vingt souches représentatives de la diversité de répartition des effecteurs ont été sélectionnées pour une inoculation en conditions contrôlées sur des cultivars d'aubergines résistants E6 et sensible E8. Six mutants défectifs ont également été inoculés sur E6 et E8 pour estimer leur implication dans l'avirulence sur E6. Les résultats obtenus mettent en évidence un ET3 conservé chez toutes les souches et des ET3 à répartition variables selon les souches. La distribution des effecteurs étudiés se structure en onze profils et un polymorphisme de taille des ET3 a été détecté. Les analyses phylogénétiques révèlent des cas d'incongruence pour trois effecteurs (sur cinq analysés) suggérant des événements de recombinaison. Enfin les résultats d'inoculation des mutants montrent que cinq effecteurs pourraient être reconnus par les mécanismes de la plante conduisant à la résistance durable de E6.

**Mots-clés :** *Ralstonia solanacearum*, effecteur de type III, répertoires de gènes, phylogénie, flétrissement bactérien

**Abstract :** *Ralstonia solanacearum* is a beta proteobacterium with a complex taxonomy, able to infect 250 host plant species and causes bacterial wilt. In order to assess resistance durability, it is important to understand the functions of type III effectors that are major determinant of virulence in the bypassing or the activation of plant resistance. This study attempted to highlight involved effectors in virulence specificity on eggplant. Ten putatively T3E associated to virulence were amplified by polymerase chain reaction and sequenced in a 91 bacterial strain collection. Eight housekeeping genes were also amplified and sequenced in order to generate phylogenetic tree of the strains. Housekeeping phylogenetic tree have been compared to T3E ones. Twenty strains representative of the variability of T3Es' distribution were selected for pathogenicity controlled condition-tests on resistant E6 and susceptible E8 eggplants. Six defective mutants were also tested on E6 and E8 in order to estimate their implication in E6-avirulence. Results showed one conserved T3E among all strains and other T3E with a variable distribution depending on strains. T3E distribution is structured in 11 profiles and length polymorphisms were detected. Phylogenetic analysis showed phylogenetic incongruence for three T3E (among five studied) suggesting recombination events. Last, mutant tests showed five T3E that could be recognized by plant mechanisms leading to durable resistance of E6.

**Keywords:** *Ralstonia solanacearum*, type III effectors, T3E repertoire, phylogeny, bacterial wilt